

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

THÈSE PRÉSENTÉE À
UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOPHYSIQUE

PAR
JOËL GAGNÉ

IMPACTS DE L'ENRICHISSEMENT COGNITIF ET DU
DIABÈTE SUR LA FONCTION GLUTAMATERGIQUE CHEZ
LE RAT : une analyse intégrée des aspects biochimiques et
électrophysiologiques de l'hippocampe

MAI 1999

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Me voici à la rédaction d'une section très importante de ce document puisque cette thèse de doctorat a été rendue possible grâce au soutien reçu par de nombreuses personnes. Les premières personnes que je tiens à remercier sont particulièrement mes parents et ma famille. Ces derniers m'ont toujours soutenu moralement et financièrement dans mon cheminement collégial et universitaire. Comment pourrais-je oublier de dire merci au Dr Guy Massicotte pour m'avoir épaulé, à tous points de vu, durant les dernières années. Sa disponibilité, son soutien et son dévouement envers moi m'ont permis de parvenir aux plus hauts sommets qu'un étudiant puisse rêver d'atteindre au cours de ses études graduées.

J'aimerais aussi dire merci au seul et unique Luc Marchand pour ses précieux conseils techniques et personnels, mais aussi pour m'avoir toujours écouté, tant dans mes moments de gloire que de déchéance!

De plus, j'aimerais remercier ceux qui ont contribué à la réalisation de mes travaux de doctorat et m'ont aidé à la rédaction de la présente thèse. Merci à Julie Bernard pour ses nombreuses connaissances théoriques et expérimentales transmises, merci à Chantale Chabot pour son appui professionnel et personnel, merci à Caroline Giguère pour sa fougue scientifique et ses conseils personnels, merci à Michel Baudry pour m'avoir accueilli dans son laboratoire en Californie et pour ses nombreuses lettres de références, merci à Maria-Grazia Martinoli, Thomas Foster et François Trudeau pour leurs collaborations avec notre équipe scientifique de Trois-Rivières, merci à Luc Lapierre (alias Junior) pour son support

didactique et instructif, merci à Othman Ghribi pour ses conseils de grand frère, merci à Martine Girard pour son aide grammaticale et son charisme et merci à Ahmed Lahsaini pour sa coopération.

Finalement, j'aimerais dire un dernier merci à ma femme Patricia pour son support et sa compréhension à mon égard pendant la réalisation de mes travaux de doctorat et surtout lors de la rédaction de cette thèse.

RÉSUMÉ

La potentialisation à long terme (ou LTP) est définie comme une hausse quasi permanente de la capacité des neurones de l'hippocampe à transmettre l'influx nerveux suite à l'application d'une stimulation électrique de haute fréquence. La LTP, une forme électrophysiologique de plasticité neuronale, est actuellement l'un des modèles expérimentaux les plus utilisés pour l'exploration des propriétés physiologiques de la mémoire. Étant donné que les neurones de type glutamatergique occupent un rôle crucial dans la régulation de la LTP (et de la mémoire), il a été proposé que la hausse de la transmission neuronale observée lors de ce phénomène découle d'une augmentation dans la sensibilité d'un sous-type de récepteurs pour le neurotransmetteur glutamate. Selon la majorité des spécialistes, c'est vraisemblablement l'altération des récepteurs postsynaptiques de type AMPA pour le glutamate qui assurerait le maintien de la LTP dans la région dite CA₁ de l'hippocampe.

Cependant, de nombreuses données expérimentales ont révélé que l'apparition de la LTP hippocampale nécessite, dans une première étape, la participation des autres sous-types de récepteurs glutamatergiques. En effet, il existe de nombreuses évidences expérimentales qui démontrent que l'apparition de la LTP est avant tout le résultat d'une activation transitoire des récepteurs NMDA (pour N-méthyl-D-aspartate) pour le neurotransmetteur glutamate. Les informations recueillies à ce jour ont établi que l'ouverture du canal ionique associé au récepteur NMDA, ainsi que l'influx de calcium qui en résulte dans la portion postsynaptique des neurones, contribuent à l'établissement des mécanismes cellulaires

d'induction de la LTP. Cette importante entrée de calcium dans l'élément postsynaptique conduirait, à son tour, à l'activation de certaines enzymes comme les kinases, les protéases et les phospholipases. Une fois activés, ces systèmes enzymatiques pourraient être en mesure de modifier les propriétés électrophysiologiques et biochimiques des récepteurs AMPA et par conséquent de permettre le maintien de la LTP.

Le principal objectif du présent travail visait essentiellement à mettre en lumière l'importance de la modulation des récepteurs AMPA pour le glutamate dans des conditions susceptibles de modifier, d'une part, l'expression de la LTP hippocampale et d'autre part, les fonctions cognitives des animaux de laboratoire. Notre première série d'études a permis de révéler que les récepteurs AMPA des neurones glutamatergiques de l'hippocampe sont modifiés chez les animaux soumis à une période d'enrichissement cognitif, et ce, tant au niveau électrophysiologique que biochimique. Par exemple, on note une hausse importante de la réponse électrophysiologique assurée par les récepteurs AMPA chez les animaux enrichis, un effet qui semble attribuable à une augmentation de l'affinité du récepteur AMPA pour le neurotransmetteur glutamate. De plus, nos résultats montrent que ces changements de liaison au récepteur AMPA puissent être générés par l'activation endogène d'enzymes dépendantes du calcium, comme les phospholipases.

Par ailleurs, on observe une baisse importante de la capacité des récepteurs AMPA à transmettre l'influx nerveux dans la région CA₁ de l'hippocampe des animaux cognitivement affaiblis par le diabète. Fait intéressant, cette réduction de la fonction des neurones glutamatergiques chez les animaux diabétiques semble ici attribuable à une baisse

substantielle de l'affinité du récepteur AMPA. De plus, on note chez les animaux diabétiques une incapacité à produire le phénomène de la LTP dans la région CA₁ de l'hippocampe. Cette perte de LTP lors du diabète résulte possiblement d'une réduction dans la capacité des enzymes dépendantes du calcium à moduler les propriétés biochimiques des récepteurs AMPA. Ce dernier effet pourrait lui-même être attribuable à une modification du niveau d'expression de la sous-unité GluR₁ composant le récepteur AMPA.

Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que les modifications du comportement cognitif chez le rat sont étroitement liées à des changements des propriétés électrophysiologiques et biochimiques des récepteurs AMPA pour le neurotransmetteur glutamate. Or, nous croyons que la découverte des mécanismes responsables de ces modifications au niveau des neurones glutamatergiques permettra de cibler à l'échelle moléculaire les bases physiologiques assurant les processus d'apprentissage et de mémorisation.

TABLES DES MATIÈRES

Remerciements	ii
Résumé	iv
Table des matières	vii
Listes des figures	xiii
Listes des tableaux	xvi
Listes des abréviations	xvii
 CHAPITRE 1: INTRODUCTION GÉNÉRALE	 1
1.1 Historique des travaux sur la mémoire	2
1.2 Rôle de l'hippocampe dans la mémoire	4
1.3 La fameuse synapse de Hebb et la potentialisation neuronale	7
1.4 Aspect neurochimique des neurones plastiques	11
1.4.1 Les récepteurs NMDA	11
1.4.1.1 Propriétés pharmacologiques et électrophysiologiques	11
1.4.1.2 Propriétés physiopathologiques	14
1.4.2 Les récepteurs AMPA	15
1.4.2.1 Aspect électrophysiologique et pharmacologique	15
1.4.2.2 Aspect moléculaire	16
1.4.3 Les récepteurs kainate	16
1.4.4 Le récepteur métabotrope	18

1.5	Mécanismes cellulaires de la plasticité neuronale	21
1.6	Mécanismes d'induction de la LTP hippocampale	23
1.7	Expression et maintien de la LTP	27
1.7.1	LTP et hypothèse présynaptique	27
1.7.2	LTP et hypothèse postsynaptique	30
1.8	Mécanismes biochimiques de la régulation des récepteurs AMPA	32
1.8.1	LTP et enzymes dépendantes du calcium	34
1.8.1.1	Les protéines kinases	34
1.8.1.2	La calpaïne	35
1.8.1.3	Les phospholipases	37
1.9	Enrichissement cognitif, diabète et mémoire	40
1.9.1	Enrichissement cognitif	40
1.9.2	Diabète	41
2.0	Hypothèses et objectifs	43

CHAPITRE 2 - Première Partie: MECHANISM OF ALTERED SYNAPTIC STRENGTH DUE TO EXPERIENCE: RELATION TO LONG-TERM POTENTIATION	46
- Résumé du deuxième chapitre	47
- Mechanism of altered synaptic strength due to experience:	
relation to long-term potentiation	49
- Abstract	50

- Introduction	51
- Materials and methods	53
- Differential housing procedures	53
- Electrophysiology	53
- Binding assays	55
- Results	58
- Electrophysiology	58
- Binding assays	59
- Discussion	61
- References	65
- Figure legends	71

CHAPITRE 2 - Deuxième Partie: AMPA RECEPTOR PROPERTIES IN ADULT RAT HIPPOCAMPUS FOLLOWING ENVIRONMENTAL ENRICHMENT ... 80

- AMPA receptor properties in adult rat hippocampus	
following environmental enrichment	81
- Abstract	82
- Classification terms	82
- Introduction	83
- Materials and methods	86
- Environmental enrichment and tissue preparation	86
- Preparation of oligonucleotide and in situ hybridization	86

- Electrophoresis and immunoblotting	87
- ³ H-AMPA binding	87
- Autoradiography	88
- Results	89
- In situ hybridization and immunoblotting analysis	89
- Modulation of ³ H-AMPA binding by calcium and PS in enriched rats	90
- Discussion	92
- Figure Legends	96
- References	98

CHAPITRE 3 - Première partie: BINDING OF GLUTAMATE RECEPTORS IN STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES IN RATS 109

- Résumé du troisième chapitre	110
- Binding of glutamate receptors in streptozotocin-induced diabetes in rats	112
- Summary	113
- Introduction	114
- Research design and methods	116
- Hyperglycemia production and tissue preparation	116
- Binding assays for glutamate receptors	116
- Electrophoresis and immunoblotting of AMPA receptor subunits	117
- Results	119

- Quantitative ^3H -AMPA and ^3H -glutamate binding autoradiography of rat horizontal sections: effect of STZ-induced diabetes	119
- Effect of STZ-induced diabetes on GluR1 and GluR2/3 immunolabelling in hippocampal synaptic membranes	120
- Discussion	122
- References	125
- Figure legends	131
 CHAPITRE 3 - Deuxième partie: IMPAIRED MODULATION OF AMPA RECEPTORS BY CALCIUM-DEPENDENT PROCESSES IN STREPTOZOTOCIN- INDUCED DIABETIC RATS	136
- Impaired modulation of AMPA receptors by calcium-dependent processes in streptozotocin-induced diabetic rats	137
- Summary	138
- Introduction	139
- Materials and methods	141
-Hyperglycemia production	141
- Hippocampal slice preparation for electrophysiology	141
- Autoradiography and binding assays for AMPA receptors	142
- Results	144
- LTP and LTD characteristics in hippocampal slices from STZ-treated rats	144

- Modulation of ^3H -AMPA binding by calcium-dependent processes in STZ-treated rats	145
- Discussion	147
- References	152
- Figure legends	161
CHAPITRE 4: DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALES	167
- Discussion	168
- Conclusion	180
RÉFÉRENCES	182

Liste des figures

CHAPITRE 1

- Figure 1: Localisation anatomique de l'hippocampe dans le cerveau	5
- Figure 2: Postulat de Hebb	8
- Figure 3: Représentation de la LTP telle que reproduite en laboratoire	10
- Figure 4: Représentation schématique du récepteur NMDA	12
- Figure 5: Illustration représentant les différentes régions de l'hippocampe	22
- Figure 6: État du récepteur NMDA au repos et activé	26
- Figure 7: Induction, développement et maintien de la LTP	33
- Figure 8: Illustration montrant l'état du récepteur AMPA avant et après LTP	39

CHAPITRE 2 - Première partie

- Figure 1: Illustration of electrode configuration and extracellular field potentials by activation of medial perforant path	74
- Figure 2: Experience-related increases in synaptic strength are not associated with a change in the paired-pulse ratio	75
- Figure 3: Effect of environmental enrichment on LTP expresssion in Gyrus Dentatus of rat hippocampus	76
- Figure 4: Photomicrographs of autoradiograms showing the distribution of [³ H]AMPA binding for brain sections from rats exposed to environmental enrichment or individually-housed control rats	77
- Figure 5: Effect of enrichment on glutamate receptor binding in different	

areas of the brain	78
- Figure 6: Percent change in glutamate receptor binding in different areas of the hippocampus	79
 CHAPITRE 2 - Deuxième partie	
- Figure 1: In situ hybridization of GluR2 Flip and Flop mRNAs in the rat hippocampus after environmental enrichment	104
- Figure 2: Quantitative expression of mRNA levels for different AMPA receptor subunits in the rat hippocampus after environmental enrichment	105
- Figure 3: Protein levels of GluR1 and GluR2/3 subunits in hippocampal membranes after environmental enrichment	106
- Figure 4: Effect of environmental enrichment on the calcium-induced increase in ³ H-AMPA binding in rat brain sections	107
- Figure 5: Effect of environmental enrichment on the PS-induced increase in ³ H-AMPA binding in rat brain sections	108
 CHAPITRE 3 - Première partie	
- Figure 1: Effect of STZ treatment on ³ H-AMPA binding in horizontal sections	133
- Figure 2: Effect of STZ treatment on ³ H-glutamate binding on the NMDA site in horizontal sections	134
- Figure 3: Effect of STZ treatment on GluR1 and GluR2/3 in hippocampal membranes	135

CHAPITRE 3 - Deuxième partie

- Figure 1: Effect of STZ treatment on LTP and LTD in area CA₁ of the
hippocampus 163
- Figure 2: Effect of STZ treatment on NMDA- and AMPA-mediated components
of synaptic responses in area CA₁ of the hippocampus 164
- Figure 3: Effect of STZ treatment on the calcium-induced increased in ³H-AMPA
binding in the hippocampus from rat brain sections 165
- Figure 4: Effect of STZ treatment on the PLA2- and melittin-induced increase in
³H-AMPA binding in synaptoneurosomes from the rat hippocampus 166

Liste des tableaux

Tableau 1: Propriétés pharmacologiques et physiologiques

des récepteurs au glutamate 20

Table 1: Modulation of ^3H -AMPA binding in different brain structures following

environmental enrichment: effects of calcium and

phosphatidylserine (PS) 103a

Liste des abréviations

AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionate
^3H -AMPA	AMPA tritié
AP5 ou APV	D-2-amino-5-phosphonopentanoate
AP7	D(-)-2-amino-7-phosphonoheptanoic acide
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ASP	aspartate
Ca^{2+}	calcium
CA (1-4)	corne d'Ammon
CaM-KII	protéine kinase II calcium/calmoduline-dépendante
CNQX	6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
CO	monoxyde de carbone
CPP	acide (2-carboxypiperazine-4-yl) propyl-1-phosphonique
DAG	diacylglycérol
DNQX	6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione
DZKA	(2'S, 3'S, 4'R)-2'-carboxy-4'-(2-diazo-1-oxo-3,3,3-trifluoropropyl)- 3'-pyrrolidinyll acetate
FWD	(S)-5-fluorowillardine
GLU	glutamate
^3H -glutamate	glutamate tritié
GluR1-4	sous-unité 1 à 4 du récepteur AMPA

GluR5-7	sous-unité 5 à 7 du récepteur kaïnate
GYK153655	2,3-benzodiazepine
Ibo	ibotenate
IP ₃	inositol triphosphate
L-AP3	L-2-amino-3-phosphonopropionate
L-AP4	L-1-amino-4-phosphonobutanoate
LTD	dépression à long terme (long-term depression)
LTP	potentialisation à long terme (long-term potentiation)
SHF	stimulation électrique de haute fréquence
MK-801	5-méthyl-10,11-dihydro-5H-dibenzocyclohepten-5,10-imine maleate
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NO	oxyde nitrique
NR1-NR2A-D	différentes sous-unités du récepteur NMDA
PCP	phencyclidine
PKC	protéine kinase C
PLA ₂	phospholipase A ₂
PLC	phospholipase C
PS	phosphatidylsérine
Quis	quisqualate
STZ	streptozotocin
t-ACPD	acide (±)-1-aminocyclopentane-trans-1,3-dicarboxylique
Zn ²⁺	zinc

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1. INTRODUCTION

1.1 Historique des travaux sur la mémoire

Au début du XXe siècle, les hommes de science qui étudiaient le cerveau s'étaient tournés vers la phrénologie, une science qui apportait une réponse rapide et facile pour tenter d'expliquer l'intelligence humaine et la mémoire des individus. Cette science soutenait qu'on pouvait déduire les fonctions du cerveau à partir d'un simple examen de la forme du crâne et, en particulier, des bosses qu'il recèle! Malgré les protestations de certains chercheurs, la phrénologie eut ses revues scientifiques, ses congrès et devint rapidement un phénomène populaire. Certains prétendaient même déceler des traits psychologiques individuels suite à l'examen des particularités anatomiques crâniennes, et plusieurs affirmaient avoir découvert la bosse de la mémoire. Dans cette optique, la phrénologie amenait la possibilité d'estimer et de juger "objectivement" les qualités cognitives des individus, et le parlement britannique proposa de sélectionner ses membres parmi les candidats dont les bosses du crâne étaient les plus prometteuses.

Les premières expériences de laboratoire dans lesquelles fut effectuée l'ablation de petites régions cérébrales chez l'animal et l'humain ont permis de démontrer que certaines fonctions physiologiques étaient effectivement liées à l'intégrité de régions spécifiques du cerveau. Toutefois, ces mêmes études mirent en évidence que ces dites fonctions n'entretenaient pas nécessairement une relation simple avec les aptitudes comportementales des sujets. Par conséquent, les nombreuses études portant sur la régionalisation de la fonction du cerveau amenèrent à considérer la phrénologie comme une science inexacte en

regard de sa supposée capacité à prédire de façon définitive les capacités cognitives des individus.

De nos jours, il est généralement admis que le stockage des informations dans le cerveau, ainsi que les modifications du comportement humain, résultent probablement d'une altération de l'activité électrique des cellules nerveuses. Wilder Penfield, fondateur de l'Institut neurologique de Montréal, fut certainement l'un des disciples les plus importants en ce qui a trait à ce concept physiologique voulant que l'activité électrique des neurones soit intimement liée aux processus de mémorisation. En 1940, Penfield effectuait des interventions chirurgicales qui visaient à prélever une partie du lobe temporal de patients épileptiques afin de soulager leurs crises. Profitant de l'état de conscience de ses patients lors de la chirurgie, Penfield stimulait électriquement leur cortex en divers points et explorait les zones opérées pour constater d'étonnants phénomènes associés à la mémoire. Par exemple, en chatouillant électriquement le lobe temporal des patients, ces derniers tombaient en pleine effervescence de souvenirs cohérents et très précis de leur enfance. Ce célèbre chirurgien n'étudiait pas spécifiquement les processus de la mémoire, mais il avait la conviction d'avoir mis le doigt sur quelque chose de fondamental dans la compréhension des processus mnésiques. Cette découverte de Penfield, montrant que le cerveau conserve minutieusement nos expériences passées au niveau de ses lobes temporaux, a effectivement permis un avancement de premier plan dans le domaine de la neurobiologie de la mémoire.

1.2 Rôle de l'hippocampe dans la mémoire

Mais quel est exactement le rôle du lobe temporal dans la mémorisation et est-ce la seule zone impliquée dans le phénomène du souvenir ? Quelques réponses à ces deux questions nous sont parvenues d'un patient connu sous les initiales H.M. et dont le prénom est Henry. En 1953, ses très graves crises d'épilepsie ont convaincu le Dr William Scoville, un chirurgien du Connecticut, de procéder à une délicate intervention chirurgicale. Cette opération consistait à effectuer l'ablation bilatérale d'une partie du système limbique nommée l'hippocampe, une petite structure en forme de cheval de mer ou de banane située dans les lobes temporaux de chaque hémisphère (**Figure 1**). L'intervention fut un succès et mit fin aux terribles crises d'Henry. Par contre, les spécialistes ont rapidement constaté que sa mémoire était perturbée de façon substantielle et ont alors décidé de le transférer à l'Institut neurologique de Montréal, où la psychologue Brenda Milner le soumit à une série de tests neuropsychologiques. Après les examens, elle conclut que ce patient souffrait d'amnésie antérograde considérable, c'est-à-dire qu'il était totalement incapable de stocker de nouvelles informations dans sa mémoire à long terme. Par exemple, il oubliait rapidement tous les événements de la vie quotidienne, y compris l'endroit où il se trouvait et ce qu'il y faisait. C'est à partir de ces données qu'il a été proposé que l'hippocampe était un centre nerveux de mémoire à court terme indispensable à la consolidation et au stockage à long terme de nouvelles informations. Néanmoins, il est important de mentionner que l'amnésie de H.M. n'affectait pas toutes les formes de mémoire.

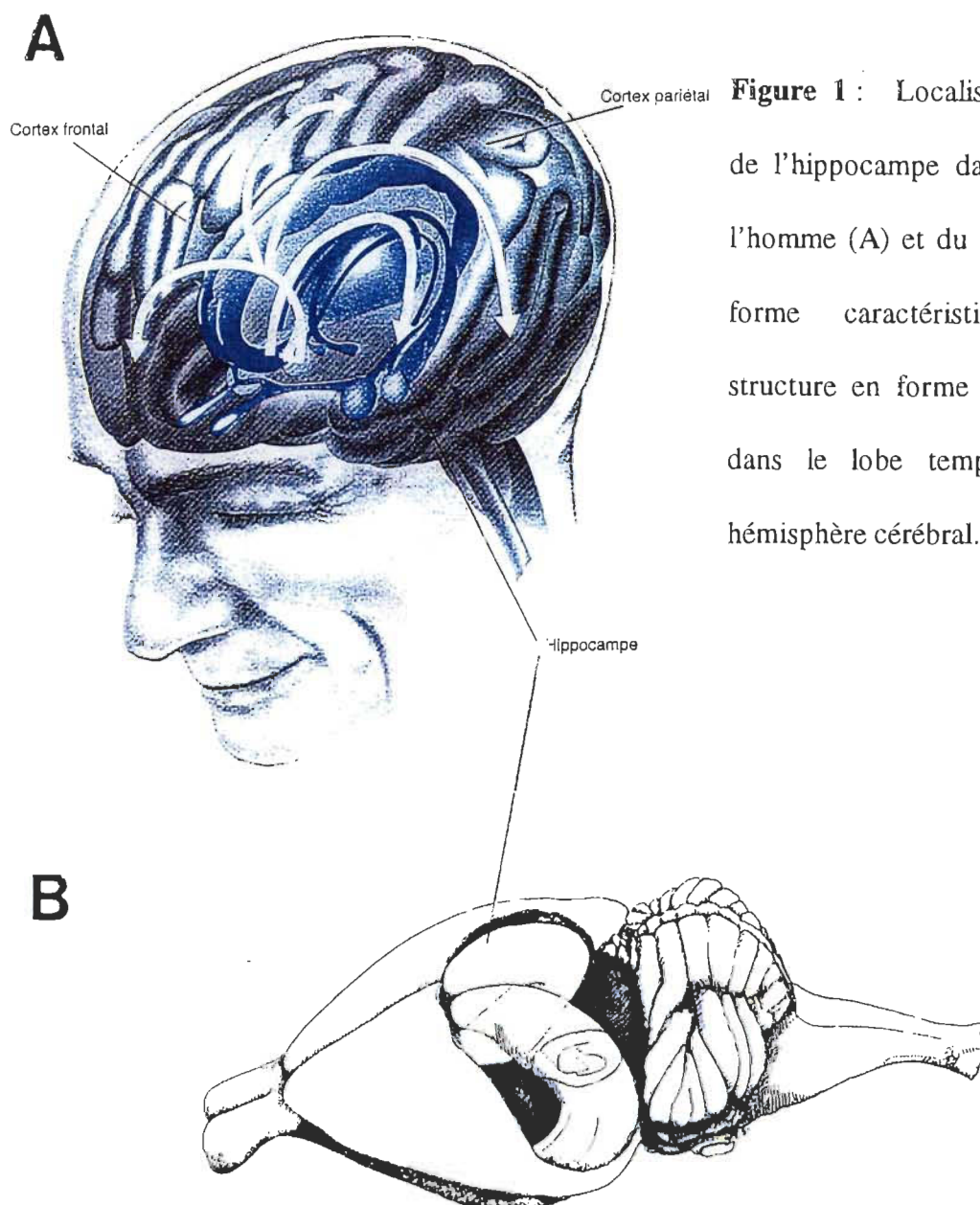


Figure 1 : Localisation anatomique de l'hippocampe dans le cerveau de l'homme (A) et du rat (B). Noter la forme caractéristique de cette structure en forme de banane située dans le lobe temporal de chaque hémisphère cérébral.

En effet, en plus des souvenirs partiels qu'Henry conserve de la période préopératoire (surtout des événements personnels), Brenda Milner constate que son patient est capable d'apprentissage et de mémorisation, mais seulement dans des domaines particuliers. Par exemple, il apprend à dessiner en regardant une image inversée dans un

miroir; plus il pratiquait cette tâche, plus il s'améliorait, bien que H.M. ne se souviennait pas d'avoir déjà effectué cet exercice. Ainsi, ces observations suggérèrent qu'une ablation bilatérale des hippocampes ne conduit pas automatiquement à la disparition de toutes les formes de mémoire puisque l'apprentissage et la mémorisation d'habiletés manuelles ne semblaient pas dépendre de cette structure cérébrale.

Au début des années 80, les Américains Neal Cohen et Larry Squire proposèrent un modèle afin d'expliquer comment une lésion de l'hippocampe n'affectait que certaines formes de mémoire. Plus spécifiquement, ces chercheurs furent les premiers à suggérer un rôle précis de l'hippocampe dans le stockage des informations de type déclaratif. Ils nommèrent *mémoire déclarative* (ou explicite) toute forme consciente de mémorisation qui concerne les faits et les événements, et définirent la *mémoire procédurale* (ou implicite) comme toute forme inconsciente de mémoire qui implique les automatismes cognitifs et les habiletés motrices, comme rouler à bicyclette, nouer un lacet ou reproduire une image à l'aide d'un miroir. Apparemment, la mémoire procédurale ne fait pas intervenir l'hippocampe, mais d'autres structures comme le cervelet. Ces observations scientifiques laissèrent entrevoir la possibilité que des circuits neuronaux spécifiques contribuent au stockage des différentes formes de mémorisation (Rogel, 1997; Zola-Morgan et coll., 1986; Cummings et coll., 1984; Woods et coll., 1982). Par la suite, grâce une approche des plus réductionnistes, les neurobiologistes s'empressèrent de rechercher à l'échelle cellulaire les mécanismes biologiques gouvernant les différentes formes d'apprentissage et de mémorisation.

1.3 La fameuse synapse de Hebb et la potentialisation neuronale

Mais quels types de modification de la structure cérébrale peut-on envisager comme substrat physiologique de la mémoire? Depuis les années quarante, les spécialistes de psychophysiologie ont débattu sur le caractère localisé ou non de la trace mnésique. Les modèles localisés suggèrent, en substance, que des souvenirs particuliers sont encodés sous forme de voies nerveuses spécifiques, i.e. dans des circuits neuronaux distincts. David Hebb leur a donné un substrat théorique en postulant l'existence d'une catégorie de neurones dont les connexions prendraient la forme de synapses pouvant être modifiées par l'expérience, ouvrant ou fermant ainsi des voies uniques de communication neuronale. L'apprentissage résulterait donc de la modification du passage d'influx nerveux le long des voies neuronales concernées par les processus de mémorisation. Au niveau cellulaire, Hebb proposa que lorsqu'un neurone A active un neurone B de façon répétée ou persistante, un phénomène de croissance ou un changement métabolique surviendrait de telle sorte que la transmission synaptique entre le neurone A et le neurone B serait plus efficace suivant cette activation neuronale (Kandel et Hawkins, 1992). Ainsi, l'information issue d'une expérience antérieure serait emmagasinée dans le cerveau par le biais d'une adaptation des contacts entre les neurones (**ou plasticité neuronale**) et en conséquence, serait susceptible d'être récupérée suite à l'activation du réseau de synapses désormais modifié. Brillant modèle cellulaire de la mémoire, mais où étaient-elles cachées ces incroyables synapses si plastiques ?

POSTULAT DE HEBB

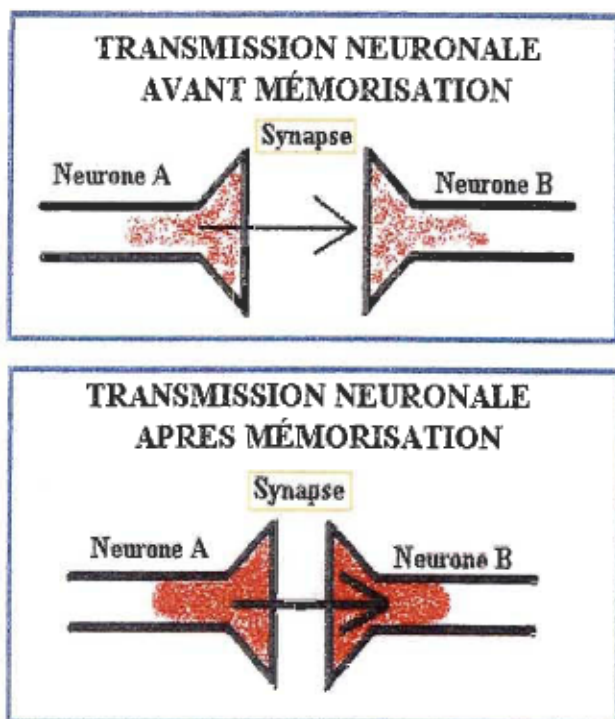


Figure 2 : Postulat de Hebb proposant un mécanisme cellulaire pouvant expliquer les changements à long terme de l'activité des neurones par une modification de la fonctionnalité des communications entre les cellules nerveuses à un site spécifique que l'on nomme synapse.

Ce n'est qu'au début des années 70 que le postulat avancé par Hebb fut vraiment appuyé par des évidences expérimentales. En travaillant sur des lapins, l'Anglais Tim Bliss et le Norvégien Terje Lomo ont montré que les neurones de l'hippocampe de ces animaux possédaient une certaine forme de plasticité synaptique comparable à ce que Hebb avait proposé (Bliss et Lomo, 1973). En effet, leurs résultats ont révélé que l'application d'une stimulation électrique de haute fréquence (ou SHF), dans l'hippocampe, permettait d'augmenter durablement l'efficacité des synapses à véhiculer l'information entre les neurones. Ce phénomène physiologique de renforcement des synapses à transmettre l'influx nerveux fut nommé potentialisation à long terme (ou LTP ; du terme anglais Long-Term Potentiation) de la transmission neuronale (**Figure 3**). Depuis cette découverte, diverses

régions à travers le cerveau semblent avoir la capacité de produire ce phénomène de potentialisation neuronale comme par exemple le néostriatum, le néocortex, l'amygdale et l'hippocampe (Maren et Baudry, 1995; Izquierdo et Medina, 1993; Calabresi et coll., 1992a). Ce modèle expérimental de mémorisation est maintenant reproduit par plusieurs groupes de recherche à travers le monde et a été proposé comme étant susceptible de représenter les bases physiologiques du stockage de certaines formes d'information (Morris et Frey, 1997; Davies et coll., 1992; Staubli et coll., 1989; Morris et coll., 1986). En particulier, il semble que l'acquisition de l'information liée à la reconnaissance de l'environnement spatial chez l'animal soit le résultat de la production endogène de LTP au niveau de la région CA₁ de l'hippocampe (Morris et Frey, 1997).

La LTP constitue un des plus brillants modèles électrophysiologiques pouvant expliquer la formation de la mémoire au niveau de l'hippocampe. Cependant, nous savons pertinemment que la mémoire est une faculté «qui oublie». Par conséquent, de nombreux chercheurs ont tenté de démontrer qu'il existe dans le cerveau des processus électrophysiologiques de plasticité neuronale responsables de l'élimination des souvenirs et/ou des informations non pertinentes (Sejnowski, 1977; Stent, 1973). Récemment, un phénomène de dépression à long terme (LTD ; du terme anglais **Long-Term Depression**) de la transmission neuronale a été rapporté dans différentes structures cérébrales comme le néocortex, le striatum, le cervelet, et l'hippocampe suivant l'application de stimulations électriques de basse fréquence (Linden, 1994; Calabresi et coll., 1992; Artola et coll., 1990). Cette diminution de l'efficacité de la synapse à propager l'influx nerveux dans l'hippocampe

serait un mécanisme physiologique susceptible de permettre, à l'opposé de la LTP, d'éliminer certains souvenirs (Goda et Stevens, 1996; Zhuo et Hawkins, 1995). Ce même phénomène de LTD pourrait, par ailleurs, empêcher la saturation des processus mnésiques susceptible de se produire au cours de l'emmagasiner de l'information. Ainsi, la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les phénomènes de plasticité synaptique, que sont la LTP et la LTD, constitue désormais une étape cruciale pour le secteur des neurosciences.

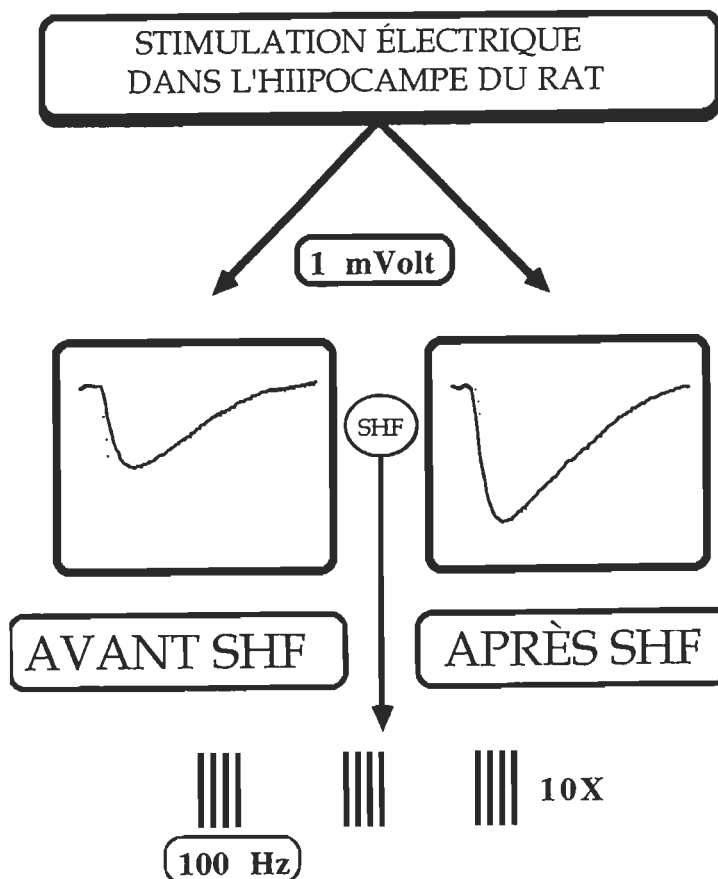


Figure 3 : Représentation de la LTP telle que reproduite en laboratoire par Bliss et Lomo en 1973. On peut constater une hausse de l'amplitude de la réponse synaptique après avoir appliqué une stimulation électrique de haute fréquence dans l'hippocampe. (SHF= dix trains de haute fréquence, composés de quatre pulsations à 100 Hz et appliqués à un intervalle de 5 Hz)

1.4 Aspect neurochimique des neurones plastiques

La plasticité neuronale représente, selon Hebb, la capacité que possède les neurones à modifier leur fonction suite à un changement de leur environnement, et il est reconnu de nos jours que le stockage des informations dans le cerveau résulte d'une modification de la fonction neurochimique des synapses. Au niveau des différentes régions du cerveau, le principal neuromédiateur assurant l'excitation des cellules nerveuses est le glutamate (Doble, 1995; Nicoll et coll., 1990). De plus, il est maintenant reconnu que ce dernier occupe un rôle prédominant dans la mise en place de la LTP hippocampale et de la formation de certains types de mémoire. Il faut savoir que le neuromédiateur glutamate agit sur les différentes structures du cerveau, telle que l'hippocampe, en activant une gamme complexe d'unités réceptrices (**Tableau 1**) (Farooqui et Horrocks, 1991; Collingridge et Lester, 1989; Monaghan et coll., 1989). Voyons, tout d'abord, les caractéristiques, tant fonctionnelles que pharmacologiques, de ces multiples récepteurs glutamatergiques.

1.4.1 Les récepteurs NMDA

1.4.1.1 Propriétés pharmacologiques et électrophysiologiques

Le récepteur NMDA se nomme ainsi parce qu'il répond spécifiquement à un agoniste pharmacologique exogène nommé le N-méthyl-D-aspartate. Ce récepteur au glutamate est composé de quatre sous-unités transmembranaires regroupées afin de former un canal à ions. De plus, le récepteur NMDA possède de multiples sites de liaison spécifique pour différents agonistes et antagonistes pharmacologiques, lesquels furent très utiles pour l'étude de ses caractéristiques électrophysiologiques et biochimiques (**Figure 4**). On retrouve, entre

autres, un site activateur liant le NMDA et le neuromédiateur glutamate (Cotman et coll., 1989), un site potentialisateur pour la glycine (Mushleh et coll., 1997; Johnson & Ascher, 1987), un site pour les polyamines (Williams et coll., 1989) et un dernier site inhibiteur pour le zinc (Mayer et Westbrook, 1987). De plus, l'intérieur du canal est capable de lier diverses molécules qui le bloquent comme le MK-801 (5-méthyl-10,11-dihydro-5H-dibenzocyclohepten-5,10-imine maléate) et le PCP (phencyclidine) (Wong et coll., 1986) (Figure 4).

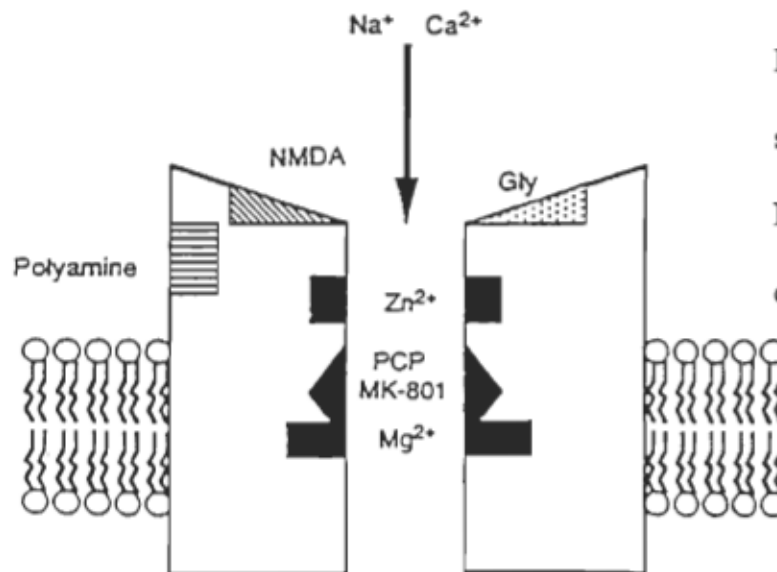


Figure 4: Représentation schématique du récepteur NMDA et de ses différents sites de liaison pharmacologiques.

Une des principales caractéristiques que possède le récepteur NMDA est d'être bloqué de manière dépendant du voltage par l'ion magnésium (Mayer et coll., 1984; Nowack et coll., 1984). Puisque le récepteur NMDA est bloqué de façon quasi permanente par le magnésium, il n'intervient pas dans la transmission synaptique de base normalement assurée par le glutamate. Cette particularité biophysique lui confère des propriétés

fonctionnelles spécifiques, compte tenu que son ouverture surviendra uniquement lorsque le potentiel membranaire atteindra un seuil d'environ -30 mV, en particulier lors d'une décharge importante de glutamate par la portion présynaptique. Dans cette optique, il est important de retenir que l'activation des récepteurs NMDA nécessite deux facteurs primordiaux, d'une part une dépolarisation membranaire suffisante et d'autre part une présence suffisante de glutamate au niveau de la jonction neuronale. Il a été proposé, d'ailleurs, qu'une stimulation électrique de haute fréquence, appliquée sur des neurones présynaptiques de l'hippocampe, permette de lever le blocage du canal NMDA par l'ion magnésium (Mayer et coll., 1984; Nowack et coll., 1984). Outre l'entrée de sodium et la sortie de potassium à travers le canal NMDA, l'activation de ce récepteur favorisera l'entrée d'une quantité importante de calcium dans l'élément postsynaptique (Murphy et Miller, 1988). C'est cette caractéristique unique que possède le canal NMDA de faire pénétrer du calcium à l'intérieur du neurone qui constitue l'élément essentiel du développement de la plasticité synaptique (Coomber, 1997; Bear et Malenka, 1994; Artola et Singer, 1993; Malenka et Nicoll, 1993; Massicotte et Baudry, 1990). Nous y reviendrons.

D'un point de vue moléculaire, le récepteur NMDA est constitué de deux types de sous-unités nommées NR1 et NR2A-D (Monyer et coll., 1992; Moriyoshi et coll., 1991). Chacune de celles-ci possèdent des caractéristiques physiologiques et pharmacologiques distinctes (Seeburg, 1993). À titre d'exemple, la sous-unité NR2 procure au récepteur NMDA une perméabilité accrue pour le calcium et cette dernière est en mesure de favoriser une accumulation plus importante de cet ion dans la structure postsynaptique. De plus, il a

été démontré qu'un assemblage différentiel des diverses sous-unités protéiques qui composent le récepteur NMDA permet de moduler la fonction synaptique de ce dernier (Wisden et Seeburg, 1993; Nakanishi et coll., 1992).

1.4.1.2 Propriétés physiopathologiques

Mis à part son rôle prédominant dans le déploiement de différentes formes de LTP, le récepteur NMDA occupe aussi une place de premier plan dans le développement du système nerveux (McDonald et Johnston, 1990; Cotman et coll., 1989). Il est reconnu que le complexe NMDA assure, fort probablement, l'établissement des connexions synaptiques et l'élimination sélective des neurones surnuméraires dans les cerveaux des jeunes animaux (Kaczmarek et coll., 1997). En ce sens, de nombreuses études ont démontré que l'injection d'AP-5, un antagoniste du récepteur NMDA, inhibe la croissance neuronale des cellules en culture (Davies et coll., 1992). Outre son rôle physiologique, l'activation des récepteurs NMDA semble intervenir dans l'établissement de diverses conditions pathologiques à caractère neurodégénératif (Doble, 1995; Farooqui et Horrocks, 1991; Olney, 1989). Selon plusieurs neurobiologistes, une activation excessive de ce type de récepteur induit une entrée démesurée de l'ion calcium dans les neurones sensibles au glutamate, provoquant ainsi la destruction des diverses composantes cellulaires. À titre d'exemples, les dommages cérébraux induits par l'ischémie, l'hypoglycémie, l'épilepsie et la chorée de Huntington sont possiblement associés à une activation importante des récepteurs NMDA, conduisant ainsi à une entrée de calcium indéniablement toxique pour les neurones (Farooqui et Horrocks, 1991; Cotman et coll., 1989).

1.4.2 Les récepteurs AMPA

1.4.2.1 Aspect électrophysiologique et pharmacologique

Le récepteur AMPA se caractérise par sa grande capacité à reconnaître, de façon préférentielle, l'agoniste α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionate (AMPA). La stimulation de ce récepteur au glutamate, par l'entremise de cet agoniste, induit une entrée importante de sodium dans la cellule accompagnée d'une sortie équivalente d'ions potassium vers l'extérieur de celle-ci; le courant calcique à travers ce récepteur est négligeable par rapport à celle survenant lors de l'activation du récepteur NMDA (Burnashev et coll., 1995; Keller et coll., 1992). Au cours des dernières années, de nombreuses études ont tenté d'identifier les rôles physiologiques des récepteurs AMPA (Monaghan et coll., 1989). Par exemple, grâce à l'utilisation d'agonistes et d'antagonistes pharmacologiques spécifiques, il a été possible de mettre en évidence que le récepteur AMPA assure fort probablement la majeure partie des effets excitateurs du glutamate lors de la transmission synaptique de basse fréquence (Mayer et Westbrook, 1987). Les agonistes pharmacologiques du récepteur AMPA sont, principalement, l'AMPA, le quisqualate, le kaïnate et le (S)-5-fluorowillardiine (FWD) (Hawkins et coll., 1995). Les composés dérivés de la quinoxaline (CNQX: 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione et DNQX: 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione) sont, par ailleurs, des antagonistes compétitifs particulièrement efficaces pour réduire l'activation des récepteurs de type AMPA.

1.4.2.2 Aspect moléculaire

Au niveau des caractéristiques moléculaires, diverses études ont révélé l'existence d'au moins quatre ARNm codant pour les différentes sous-unités du récepteur AMPA. Le complexe récepteur de type AMPA résulte fort probablement de l'agencement différentiel de quatre sous-unités protéiniques appelées GluR1-4 (Seeburg, 1993). De plus, il a été démontré que l'épissage alternatif des ARNm codant pour chacune des sous-unités du récepteur AMPA engendre la production de deux versions distinctes de celles-ci nommées flip ou flop (Sommer et coll., 1990). Fait intéressant, la version flip du récepteur est normalement associée à la production d'une transmission neuronale beaucoup plus importante que celle générée par la version flop. Il a été démontré que les ARNm des différentes sous-unités du récepteur AMPA sont sujet à une régulation de leur expression au cours de la période postnatale (Standley et coll., 1995; Pelligrini-Giampietro et coll., 1991), Compte tenu du fait qu'il est très difficile de reproduire chez le jeune animal le phénomène de la LTP (Chabot et coll., 1996; Muller et coll., 1989), il fut proposé que ce déficit d'ordre électrophysiologique résulte fort probablement d'un arrangement particulier des sous-unités (GluR1-4 flip ou flop) qui composent les récepteurs membranaires de type AMPA durant la période du développement (Wisden et Seeburg, 1993; Nakanishi, 1992).

1.4.3 Les récepteurs Kainate

Dans le passé, l'absence d'agonistes et d'antagonistes spécifiques pour ce type de récepteur au glutamate a rendu difficile la mise en évidence de récepteurs kainate possédant des caractéristiques biochimiques et fonctionnelles distinctes de celles des récepteurs

AMPA. C'est la raison pour laquelle, dans la littérature scientifique, on présente les récepteurs ionotropes non-NMDA en utilisant souvent le terme récepteur AMPA/kainate. Néanmoins, certains récepteurs sensibles au kainate possèdent des particularités qui permettent de les distinguer des autres récepteurs glutamatergiques (Lerma et coll., 1997; Vignes et Collingridge, 1997). En effet, une faible proportion des récepteurs kainate possèdent une haute affinité pour le ^3H -kainate et sont particulièrement sensibles à l'action de l'acide domoïque, une toxine retrouvée dans certains crustacés. Ces sites sont retrouvés en forte concentration dans les fibres moussues de l'hippocampe et sont majoritairement localisés sur la portion présynaptique du neurone. D'un point de vue physiologique, l'activation accrue de ces récepteurs présynaptiques favoriserait une relâche exorbitante de glutamate, ce qui causerait, notamment, des dommages neuronaux irréversibles dans la région CA₃ de l'hippocampe (Ben-Ari et coll., 1988).

Par ailleurs, les récentes découvertes d'un agoniste, le (S)-5-fluorowillardiine (Hawkins, 1995) et d'un antagoniste, le GYK153655 (Lerma et coll., 1997), plus spécifiques pour le récepteur AMPA, ainsi que celle d'un nouvel antagoniste pour les récepteurs kainate, le DZKA (Willis et coll., 1997), permettront de mieux caractériser les aspects biochimiques et fonctionnels de ces récepteurs. De plus, de récentes données obtenues grâce à l'utilisation des outils de la biologie moléculaire ont permis de révéler l'existence de gènes uniques (GluR5-7 et KA1-2) codant pour les différentes sous-unités du récepteur kainate (Nakanishi, 1992). Ces découvertes seront assurément déterminantes pour

la reconstruction *in vitro* de ce type de récepteur glutamatergique et, par conséquent, primordiales pour en effectuer une caractérisation plus approfondie.

1.4.4 Le récepteur métabotrope

Le récepteur métabotrope sensible à l'action du glutamate et de l'acide quisqualique se distingue des récepteurs à canaux (ou ionotropes) par sa capacité à générer une cascade biochimique complexe. En particulier, la stimulation de cette unité réceptrice enclenche la production de seconds messagers cellulaires survenant suite à l'activation d'une phospholipase C (PLC), une enzyme couplée à un système membranaire de protéine G (Sladeczek et coll., 1988). L'activation de cette PLC entraîne, pour sa part, une hydrolyse du phosphoinositol biphosphate (PIP_2) membranaire, une substance qui permet la formation immédiate de deux métabolites cellulaires, l'inositol triphosphate (IP_3) et le diacylglycérol (DG) (Berridge, 1984). Divers travaux ont démontré, par ailleurs, que le DG formé par l'intermédiaire du récepteur métabotrope induit la stimulation d'une protéine kinase C (Bramham et coll., 1994; Farooqui et coll., 1988), une enzyme reconnue pour phosphoryler diverses protéines contenues dans les cellules nerveuses. À cet égard, il est intéressant de souligner que le récepteur AMPA est l'une des composantes membranaires susceptible d'être phosphorylé par la protéine kinase C (Akers et coll., 1986). Pour sa part, l' IP_3 assure, lorsque libéré de la membrane neuronale, une mobilisation cytosolique du calcium contenu dans le réticulum endoplasmique lisse (Berridge, 1984). Cet effet intracellulaire de l' IP_3 permettrait d'assurer, lors d'une activation transitoire des récepteurs NMDA, une relâche intracellulaire prolongée de l'ion calcium dans l'élément postsynaptique.

Au niveau des données électrophysiologiques, quelques études ont proposé que la stimulation de ce récepteur contribue à la mise en place du processus de la LTD dans la structure cérébelleuse (Linden et Connor, 1995; Zuo et Hawkins, 1995). D'autres études ont suggéré que l'excitation du récepteur métabotrope est aussi nécessaire au déploiement de la LTP dans la région CA₁ de l'hippocampe (Bashir et coll., 1993; Sergueeva et coll., 1993). En particulier, il a été démontré que des animaux transgéniques ne possédant pas de récepteurs métabotrobes de type 5 (mGluR5) ont de sérieux problèmes d'apprentissage pour des tâches visuo-spatiales ainsi qu'une incapacité à générer la LTP dans la région CA₁ de l'hippocampe (Lu et coll., 1997). Les raisons expliquant la nature différentielle de la contribution des récepteurs métabotropes dans la LTD ou la LTP restent à préciser.

Récepteurs	NMDA	AMPA	Kaïnate	Métabotropes
AGONISTES	glu, asp, NMDA, ibo	AMPA, FWD, quis, glu, kaïnate	domoate, kaï, quis AMPA, FWD, glu	quis, glu, ibo, t-ACPD,
ANTAGONISTES	AP7, AP5 (ou APV), CPP	GYK153655, CNQX=DNQX	DZKA, CNQX=DNQX	L-AP3, L-AP4, MCPG
Bloqueurs du Canal	TCP, MK-801, Mg ²⁺ , kétamine	Barbiturates, Philanthotoxine	————	————
Particularités	Possède un site glycine, Localisation pré et postsynaptique	Localisation pré- et postsynaptique; Majorité post.; Présents sur les cellules Gliales	Localisation pré- et postsynaptique; Majorité pré.	Localisation pré- et postsynaptique
Effets Membranaires	Dépolarisation excitatrice lente	Dépolarisation Excitatrice rapide	Dépolarisation excitatrice rapide	Dépolarisation excitatrice lente
Couplage	Canal calcium, sodium et potassium	Canal sodium et potassium	Canal sodium et potassium	PLC ⇒ IP ₃ +DG
Composantes moléculaires (sous-unités du récepteur)	NR1 NR2A-D	GluR1-4 (A-D) Versions flip et flop	GluR5-7 Ka1 et Ka2	mGluR1α-β mGluR2-6

Tableau 1 : Principales propriétés pharmacologiques et physiologiques des récepteurs au glutamate.

1.5 Mécanismes cellulaires de la plasticité neuronale

Les informations présentées dans les sections précédentes de cet ouvrage convergent pour démontrer que l'activation des récepteurs glutamatergiques joue un rôle prédominant dans la formation de la potentialisation neuronale (ou LTP). Au sein de la structure hippocampale, il est toutefois possible de générer des formes de potentialisation qui se distinguent tant par leurs mécanismes cellulaires d'induction que par leurs localisations au sein de cette structure anatomique. Dans cette optique, nous aborderons dans la section qui suit les mécanismes cellulaires mis en cause pour expliquer les différentes formes de LTP dans les diverses régions de l'hippocampe. Voyons tout d'abord comment s'organise, d'un point de vue anatomique, cette structure particulière du cerveau.

Il faut savoir que la région hippocampale constitue la portion du système limbique qui borde le ventricule latéral ; le système limbique regroupe les structures du cerveau qui contrôlent les aspects émotifs de notre personnalité. La grande région hippocampale comporte l'hippocampe proprement dit, le gyrus dentatus et le complexe subiculaire, contigu au cortex entorhinal (**voir Figure 5**). L'hippocampe se divise lui-même en quatre zones nommées Corne d'Ammon (CA) 1 à 4 qui se subdivisent en plusieurs couches de cellules conférant ainsi l'organisation lamellaire de cette structure. En fait, chaque zone se subdivise en cinq couches: l'alvéus, le stratum oriens, le pyramidal radiatum, le stratum lacunosum et le stratum moléculaire. L'hippocampe renferme également trois principales voies excitatrices situées entre le cortex entorhinal et la région CA₁. La voie perforante est la première reliant le cortex entorhinal aux cellules granulaires du gyrus dentatus. La seconde,

formée par les fibres moussues, est issue des axones des cellules granulaires qui se projettent aux cellules pyramidales de la région CA₃. Enfin, la dernière, qui comporte les fibres Schaffer/commissurales, origine des cellules pyramidales de la région CA₃ et de l'hémisphère contralatéral pour se terminer aux cellules pyramidales de la région CA₁ (Figure 5).

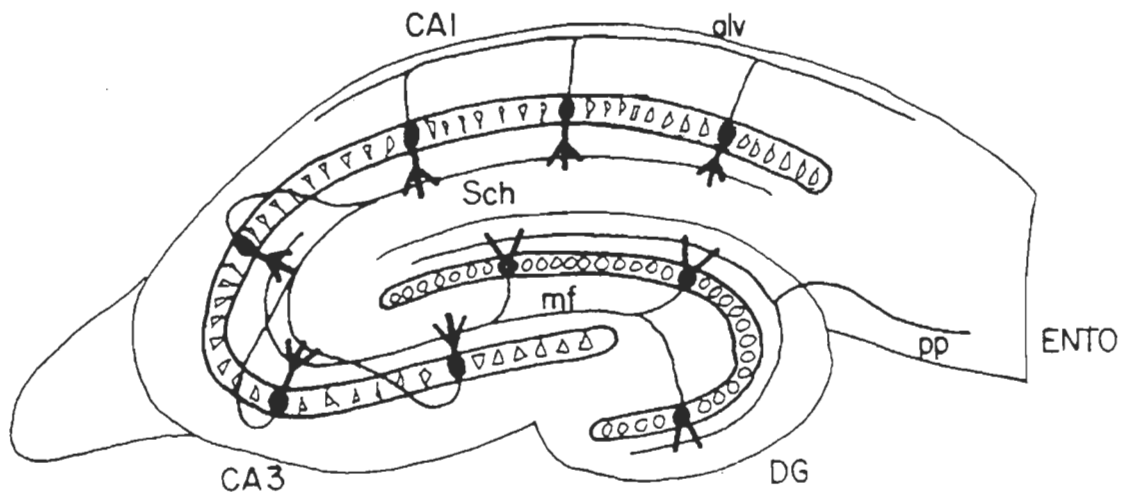


Figure 5 : Illustration représentant les différentes régions et les principales voies excitatrices qui composent l'hippocampe selon une coupe transversale. Les régions visibles comprennent la Corne d'Ammon (CA) et le gyrus dentatus (DG). On observe également la voie excitatrice perforante (pp) du cortex entorhinal (ENTO), celle constituée des fibres moussues (mf) et la dernière formée des fibres Schaffer/commissurales (Sch).

1.6 Mécanismes d'induction de la LTP hippocampale

Il est clair que l'induction de la potentialisation à long terme dans la région CA₁ de l'hippocampe nécessite une stimulation électrique de haute fréquence (SHF) dont les paramètres expérimentaux sont maintenant bien établis (Larson et coll., 1986). Le patron de stimulation électrique le plus fréquemment utilisé ressemble fortement à celui généré par les neurones de l'hippocampe lorsqu'un animal est soumis à une séance de reconnaissance spatiale (Steriade et coll., 1990; Bland, 1986). De façon plus spécifique, chez un animal engagé dans une telle situation d'exploration, le rythme cérébral enregistré par électroencéphalographie se situe entre 5 et 7 Hz, un rythme nommé thêta. On s'accorde pour reconnaître que l'apparition de ce rythme thêta dans la structure hippocampale est probablement produite par l'intermédiaire d'activités oscillatoires de nature cholinergique provenant de la région septale du cerveau (Stewart et Fox, 1990). Par ailleurs, Larson et coll. ont démontré en 1986 que le patron de stimulation idéal pour induire la LTP dans la région CA₁ de l'hippocampe contient dix trains de haute fréquence, lesquels sont composés de quatre pulsations à 100 Hz, appliqués à un intervalle de temps de 200 msec (ou 5 Hz). Cette forme de stimulation électrique, dite thêta, porte son nom en raison de son incroyable ressemblance avec le rythme électroencéphalographique noté dans la région hippocampale d'un animal en situation d'apprentissage spatial. Ce paramètre de stimulation est maintenant largement reconnu et utilisé par les électrophysiologistes pour induire le phénomène de la LTP (Aihara et coll., 1997; Staubli et coll., 1987).

Actuellement, deux mécanismes cellulaires distincts permettent d'induire la LTP dans la région CA₁ de l'hippocampe. Effectivement, l'activation des récepteurs NMDA assurerait l'induction de ce phénomène tandis que l'autre processus cellulaire serait indépendant de ces mêmes récepteurs. Dans ce cas, c'est l'activation des canaux calciques dépendants du voltage qui permettrait d'induire le phénomène de la LTP dans la région CA₁ région de l'hippocampe (Cavus et Teyler, 1998; Huber et coll., 1995). Étant donné que de nombreuses études ont démontré clairement l'importance du récepteur NMDA dans les phénomènes d'apprentissage et de mémorisation, nous allons décrire davantage le rôle de ces derniers dans l'induction et l'expression de la LTP. Il s'avère donc important de connaître quels sont les mécanismes neurochimiques mis en jeu lors de la formation de la LTP dépendante du récepteur NMDA, dans la région CA₁ de l'hippocampe. Tout d'abord, il faut savoir que la transmission neuronale de base dans cette région du cerveau est majoritairement assurée par les récepteurs glutamatergiques de type AMPA. En effet, lors d'une stimulation simple des neurones glutamatergiques de l'hippocampe, les récepteurs de type NMDA sont peu sollicités puisque la dépolarisation de la membrane postsynaptique n'est pas suffisante pour lever le blocage du canal NMDA par le magnésium. Toutefois, dans une situation de stimulation tétanique les récepteurs NMDA se verront activés, ce qui constitue l'étape cruciale pour l'apparition de la LTP, du moins dans la région CA₁ de l'hippocampe (Collingridge et coll., 1990; Larson et Lynch, 1988). De façon plus précise, nous croyons que l'application d'une SHF entraîne une libération abondante de glutamate dans la fente synaptique lequel, en se fixant sur de nombreux récepteurs AMPA, dépolarise fortement la membrane des neurones cibles. Cette importante dépolarisation permettra de

débarrasser un nombre restreint de récepteurs NMDA de leur ion magnésium pour ainsi les activer. Bien que peu nombreux à être stimulés, ces récepteurs viendront contribuer à dépolariser davantage la membrane postsynaptique et ainsi faciliter l'ouverture de récepteurs NMDA additionnels. C'est ce phénomène en cascade qui permet l'induction de la LTP dans la région CA₁ de l'hippocampe. Selon la majorité des spécialistes, c'est une entrée massive de l'ion calcium par ces canaux ioniques qui assure l'établissement de la LTP (**Figure 6**), et ce, dans certaines structures du cerveau comme l'hippocampe (région CA₁) et le cortex visuel (Neveu et Zucker, 1996; Williams et Johnston, 1989; Malenka et coll., 1988).

Au niveau physiologique, l'utilisation d'antagonistes spécifiques du récepteur NMDA a permis de mettre en valeur l'importance de ces récepteurs pour l'établissement des altérations neuronales lors du stockage de certaines informations. Par exemple, plusieurs études ont démontré que l'AP5, un antagoniste spécifique du récepteur NMDA, provoque de sérieux troubles d'apprentissage pour des tâches liées à la reconnaissance des informations visuo-spatiales chez l'animal et prévient la formation de la potentialisation neuronale dans la région CA₁ de l'hippocampe (Olney, 1989; Morris et coll., 1986). De plus, ces mêmes perturbations fonctionnelles et comportementales ont été observées chez des souris transgéniques dont la sous-unité NR2A du récepteur NMDA n'était pas exprimée (Sakimura et coll., 1995). Toutefois, malgré le rôle crucial du récepteur NMDA dans l'induction de la LTP, il est important de signaler que l'activation de ce complexe récepteur n'est pas toujours essentielle à l'induction de toutes formes de LTP. En guise d'exemple, il est reconnu que l'apparition de la potentialisation neuronale dans la région CA₃ de

l'hippocampe, provoquée par la stimulation des fibres moussues, est indépendante de l'activation de ces récepteurs (Johnston et coll., 1992). Cette forme de LTP serait plutôt associée au stockage d'informations de type autre que déclaratif (ou explicite).

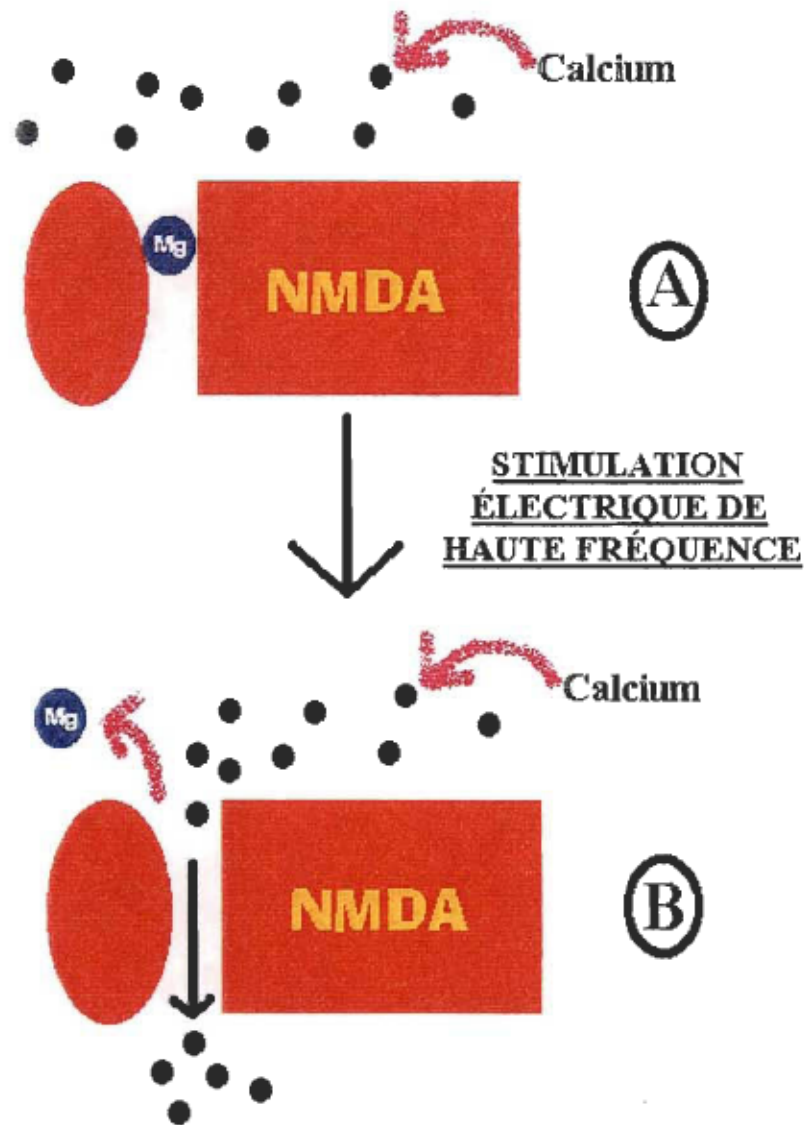


Figure 6 : (A) État du récepteur NMDA au repos. (B) État du récepteur NMDA lors d'une stimulation électrique de haute fréquence (SHF) provoquant un influx de calcium important à travers ce canal récepteur.

1.7 Expression et maintien de la LTP

Si les événements concernant l'induction et le développement de la plasticité neuronale dans la région CA₁ de l'hippocampe sont généralement bien admis, ceux responsables de l'expression et du maintien de la LTP sont toujours activement débattus au sein de la communauté scientifique. À cet égard, les informations recueillies à ce jour convergent pour supporter deux grandes hypothèses dans le cadre de cette problématique de recherche. La première hypothèse, dite présynaptique, veut qu'une augmentation de la quantité de glutamate libérée par les terminaisons nerveuses assure le maintien de la LTP (Artola et Singer, 1993), alors que la deuxième, dite postsynaptique, veut plutôt expliquer la LTP sur la base de changements des propriétés fonctionnelles et biochimiques des récepteurs AMPA pour le neuromédiateur glutamate (Gellerman et coll., 1997; Kauer et coll., 1988). À ce jour, aucune de ces hypothèses n'a pu être retenue de façon exclusive pour expliquer le maintien de la LTP, du moins dans la région CA₁ de l'hippocampe. Nous profiterons de la prochaine section pour mettre en valeur les données expérimentales qui supportent chacune de ces hypothèses.

1.7.1 LTP et hypothèse présynaptique

Comme nous l'avons mentionné auparavant, il est reconnu qu'une entrée de calcium dans la structure postsynaptique via les canaux associés aux récepteurs NMDA constitue l'étape clef du développement de la LTP. C'est cette entrée de calcium qui permettrait l'activation de divers systèmes enzymatiques impliqués dans les modifications des fonctions pré- ou postsynaptiques. Dans le cadre de l'hypothèse présynaptique, on suggère que

l'expression de la LTP dans les régions CA₃ (Son et coll., 1996; Son et Carpenter, 1996; Zalutsky et Nicoll, 1990) et CA₁ (Langdon et coll., 1995; Bliss et Collingridge, 1993; Staubli et coll., 1990) de l'hippocampe résulte d'une hausse de la relâche en glutamate par la terminaison nerveuse. Cette modification des mécanismes de relâche en neurotransmetteur suppose obligatoirement la présence d'un messenger rétrograde. En effet, compte tenu que le développement de la LTP hippocampale dépend essentiellement d'une accumulation de calcium dans la structure postsynaptique, les neurobiologistes ont depuis longtemps suspecté la présence de molécules capables d'agir à distance sur la portion présynaptique. Ces messagers rétrogrades doivent évidemment être en mesure de traverser les membranes neuronales pour venir agir sur le bouton terminal du neurone présynaptique et augmenter ainsi la relâche du neurotransmetteur glutamate. Afin de concilier l'ensemble des mécanismes d'induction et d'expression de la LTP, les chercheurs ont tenté de mettre en évidence la participation d'enzymes postsynaptiques dépendantes du calcium capables de produire de tels composés rétrogrades. Or, il a été démontré que l'acide arachidonique (Lynch et coll., 1989; Williams et coll., 1989), le monoxyde d'azote (Gribkoff et Lum-Ragan, 1992; Izumi et coll., 1992; Bohme et coll., 1991; O'Dell et coll., 1991) et le monoxyde de carbone (Verma et coll., 1993; Zhuo et coll., 1993), des substances connues pour accentuer la relâche de glutamate, sont tous produits par de telles enzymes dépendantes du calcium. Par ailleurs, des formes chimiques de LTP ont aussi été reproduites par l'application de ces composés sur des coupes d'hippocampe. Ainsi, ces molécules sont considérées être en mesure de jouer un rôle de messenger rétrograde.

La relâche d'un neurotransmetteur par une terminaison neuronale se voit contrôlée par deux grands paramètres physiologiques. En effet, le taux de libération d'un neurotransmetteur peut varier en fonction de la probabilité (P) que possède la terminaison nerveuse à relâcher une certaine quantité (ou quantum (Q)) de ce neuromédiateur. L'avènement de l'analyse quantique, comme approche électrophysiologique sophistiquée, a récemment permis de mettre en évidence que des altérations de ces paramètres physiologiques (P et/ou Q) accompagnent le développement de diverses formes de plasticité neuronale dans des préparations *in vitro* (Davis, 1995). À titre d'exemple, certains chercheurs ont démontré que la probabilité (P) de relâche en neurotransmetteur, par la portion présynaptique, était augmentée de façon durable suivant l'induction de la LTP dans la région CA₁ de l'hippocampe (Sokolov et coll., 1998; Stricker et coll., 1996). Ce type d'analyse électrophysiologique venait confirmer l'hypothèse voulant que cette forme de plasticité neuronale repose, du moins dans la région CA₁ de l'hippocampe, sur une plus grande capacité des terminaisons nerveuses à relâcher leur neurotransmetteur glutamate (Bekkers et Stevens, 1990; Malinow et Tsien, 1990).

D'autres données obtenues par analyse quantique ont toutefois laisser entrevoir la possibilité de changements postsynaptiques au cours de la LTP. En effet, Kullmann et coll. ont pu démontrer que les altérations des paramètres physiologiques qui gouvernent la relâche de glutamate au cours de la LTP sont révélées uniquement dans des conditions expérimentales faisant intervenir l'activation des récepteurs glutamatergiques de type AMPA (Kullmann et coll., 1994). Plus précisément, ce type d'analyse leur a permis de révéler que

les réponses synaptiques assurées par les récepteurs NMDA ne se voient aucunement affectées par l'apparition de la LTP dans la région CA₁ de l'hippocampe. Une augmentation de la relâche de NT au cours de la LTP aurait dû obligatoirement contribuer à produire une altération comparable des aspects fonctionnels de tous les sous-types de récepteurs glutamatergiques (AMPA et NMDA). Dans cette optique, divers groupes de chercheurs ont suggéré que le maintien de la LTP pourrait être accompagné de modifications postsynaptiques de la réponse des récepteurs de type AMPA pour son neuromédiateur glutamate (Debray et coll., 1997; Fedorov et coll., 1997; Redman, 1996; Foster et coll., 1991).

1.7.2 LTP et hypothèse postsynaptique

Comme nous venons de le mentionner, des changements dans la sensibilité de la structure postsynaptique pour le glutamate sont susceptibles de participer au maintien de la LTP dans la région CA₁ de l'hippocampe (Kullmann, 1994; Manabe et Nicoll, 1994; Ambros-Ingerson et coll., 1993; Baudry et Lynch, 1993; Ambros-Ingerson et coll., 1991; Malenka, 1991; Zalutsky et Nicoll, 1990; Kauer et coll., 1988; Muller et coll., 1988). L'utilisation de divers composés pharmacologiques connus pour interférer avec l'activation des récepteurs au glutamate a permis de démontrer que le développement de la LTP affecte de façon différentielle les réponses ioniques des récepteurs AMPA et NMDA. Fait intéressant, de multiples études électrophysiologiques ont démontré qu'une hausse progressive et sélective de la réponse de type AMPA est associée au développement de la LTP, un effet qui atteint une valeur maximale dans l'heure qui suit la période de stimulation

tétanique (Davies et coll., 1989; Kauer et coll., 1988; Muller et coll., 1988). Par ailleurs, des enregistrements électrophysiologiques ("patch-clamp") réalisés en configuration cellule entière (milieu intracellulaire du neurone en contact avec l'électrode) ont récemment démontré, qu'avant la stimulation tétranique, une bonne proportion des synapses glutamatergiques sont insensibles à l'action de leur neuromédiateur (Isaac et coll., 1995; Liao et coll., 1995). Il a été proposé que la stimulation intense des afférences glutamatergiques permettrait de transformer ces synapses, dites silencieuses, en synapses actives, lesquelles deviendraient alors aptes à répondre efficacement au glutamate (Malenka et Nicoll, 1997).

Ce serait donc l'ajout de nouveaux récepteurs de type AMPA au niveau des synapses silencieuses qui contribuerait au maintien de la LTP dans la région CA₁ de l'hippocampe. Ces diverses données électrophysiologiques sont bien sûr en accord avec les études biochimiques montrant que l'apparition de la LTP dans l'hippocampe est liée à une hausse sélective de la liaison du ³H-AMPA à son récepteur (Bernard et coll., 1994; Maren et coll., 1993; Tocco et coll., 1992b). Une des questions importantes de la neurobiologie moderne concerne la mise en évidence des mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents aux modifications biochimiques des récepteurs glutamatergiques, en particulier des récepteurs AMPA.

1.8 Mécanismes biochimiques de la régulation des récepteurs AMPA

Jusqu'à présent, nous avons constaté d'une part, que l'ion calcium joue un rôle prépondérant dans le développement de la LTP, et que, d'autre part, des changements dans les propriétés des récepteurs AMPA assurent probablement le maintien de cette forme de plasticité neuronale. Par conséquent, il est généralement admis que divers systèmes cellulaires sensibles au calcium peuvent être impliqués dans la modulation des récepteurs AMPA lors de la LTP (Maren, 1995; Malenka, 1994). Dans cette optique de multiples travaux ont été effectués afin de préciser la contribution relative de divers mécanismes enzymatiques dans la LTP. Par exemple, il a été démontré que les protéases, les kinases et les phospholipases sont possiblement associées à l'expression de la neuropotentialisation (Massicotte et coll., 1990; Malenka et coll., 1989; Seubert et coll., 1988) (**Figure 7**). Dans la section qui suit, nous verrons comment l'activation de ces systèmes enzymatiques peut contribuer aux modifications des récepteurs AMPA observées dans la LTP.

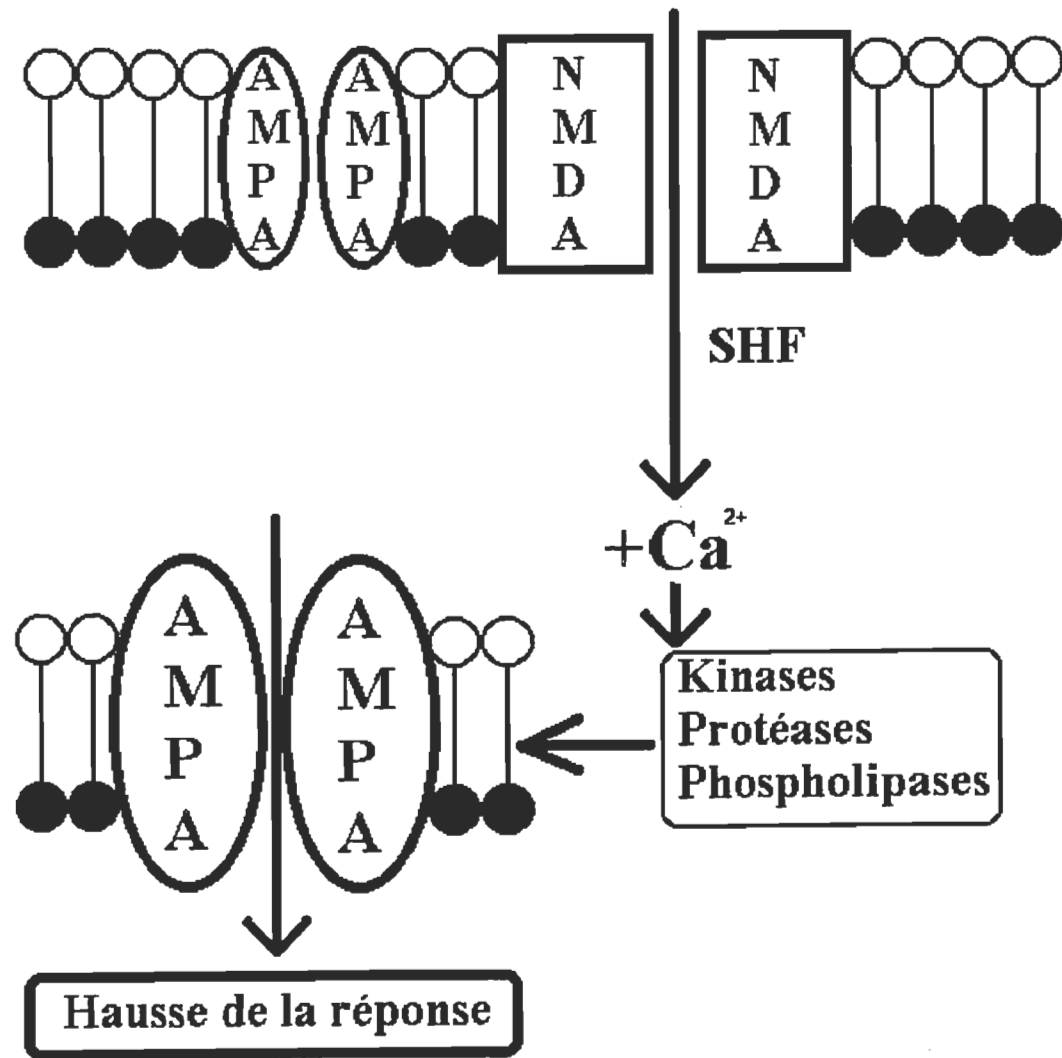


Figure 7 : Schéma récapitulatif montrant les événements cellulaires survenant lors de l'induction (SHF), du développement (Ca), et du maintien de la LTP (hausse de la réponse AMPA).

1.8.1 LTP et enzymes dépendantes du calcium

1.8.1.1 Les protéines kinases

Il est généralement bien admis que les protéines kinases ont la responsabilité de phosphoryler un grand nombre de protéines synaptiques tel que le récepteur AMPA (Angenstein et Staak, 1997; Lisman et coll., 1997; Pawson, 1994; Bar et coll., 1980). Parmi les nombreuses protéines kinases retrouvées dans la portion postsynaptique des neurones à glutamate, il y a la protéine kinase C (PKC) activée par le diacylglycérol, la phosphatidylsérine et le calcium, ainsi que la protéine kinase II calcium-calmoduline dépendante (CaM-KII) qui exige la présence de calcium et de la calmoduline pour être stimulée. C'est dans les années 80 que les chercheurs ont eu accès aux premiers inhibiteurs spécifiques de protéines kinases qui permirent de mettre en évidence le rôle prédominant de ces enzymes phosphorylantes dans le maintien de la LTP. Il fut démontré que la polymyxine B (inhibiteur de la PKC) et le calmidazolium (inhibiteur de la CaM-KII) bloquent **partiellement** la formation de la LTP dans l'hippocampe (Malenka et coll., 1989; Reymann et coll., 1988), suggérant ainsi une importante participation de ces kinases dans le développement de la plasticité neuronale. Par la suite, d'autres études ont constaté une hausse de l'activité synaptique hippocampale de la PKC et la CaM-KII suivant l'apprentissage de tâches visuo-spatiales chez l'animal (Tan et Liang, 1996; Noguès et coll., 1994) et après l'induction de la LTP à l'aide d'une stimulation tétranique (Barria et coll., 1997; Tan et Chen, 1997; Akers et coll., 1986). Une confirmation du rôle que jouent ces protéines kinases dans les phénomènes d'apprentissage et de mémorisation fut rendue possible grâce à l'arrivée des modèles de souris transgéniques qui n'expriment pas ces

enzymes neuronales (PKC et CaM-KII). En effet, les chercheurs ont noté des troubles à générer la LTP dans la région CA₁ de l'hippocampe des souris n'exprimant pas ("knock-out") la CaM-KII ou la PKC (Abeliovich et coll., 1993; Silva et coll., 1992). Toutefois, quelques études ont démontré que l'activation des kinases est assurément importante pour l'expression de la LTP, mais pas absolument nécessaire (Bach et coll., 1995; Mayford et coll., 1995; Malenka, 1994). Ils ont permis de montrer que la LTP n'est pas totalement absente chez ces animaux transgéniques et que certaines formes d'apprentissage persistent. Ces observations viennent supporter l'hypothèse voulant que d'autres systèmes enzymatiques, comme les protéases ou les phospholipases, puissent moduler l'activité du canal ionique associé au récepteur AMPA et, par conséquent, conduire à l'expression de la LTP dans l'hippocampe.

1.8.1.2 La calpaïne

Pendant plusieurs années les chercheurs ont proposé que des altérations morphologiques dans l'organisation même de la structure synaptique accompagnent la formation des souvenirs. Dans ce même ordre d'idée, Muller et coll. ont récemment démontré qu'un étalement de la zone active de la synapse survient après l'établissement de la LTP dans l'hippocampe (Buch et Muller, 1996). Or, de telles modifications morphologiques de la synapse doivent nécessiter la contribution de systèmes enzymatiques susceptibles de modifier les aspects structuraux des membranes cellulaires. Parmi les candidats étant en mesure de modifier les caractéristiques biochimiques des membranes cellulaires on trouve, la calpaïne, une enzyme reconnue pour hydrolyser certaines protéines du cytosquelette dont la spectrine.

Plusieurs évidences expérimentales supportent l'hypothèse voulant que la calpaïne joue un rôle déterminant dans le phénomène de la LTP ainsi que dans les processus sous-jacents à l'apprentissage et la mémorisation. En effet, il a été montré que la leupeptine, un inhibiteur préférentiel de la calpaïne, prévient la formation de la LTP et réduit considérablement l'efficacité pour accomplir des tâches faisant appel à la mémoire visuo-spatiale (Denny et coll., 1990; Staubli et coll., 1984).

Si l'on accepte l'idée que la calpaïne participe au maintien de la LTP, la question du rapport entre cette enzyme cellulaire et la modulation spécifique du récepteur AMPA dans la plasticité neuronale demeure entière. Pour Massicotte et ses collaborateurs, il existerait un lien entre l'hydrolyse de la spectrine par la calpaïne et la modulation biochimique des récepteurs AMPA (Baudry et Massicotte, 1992; Massicotte et Baudry, 1991). Ils proposent que les changements de ce type de récepteur par la calpaïne surviennent en réponse à un débalancement momentané de l'équilibre lipidique des membranes cellulaires, lequel est normalement conféré par les interactions de la spectrine avec certains phospholipides dont la phosphatidylsérine. Outre l'hydrolyse de la spectrine, il a récemment été démontré que la calpaïne possède une impressionnante capacité à couper le récepteur AMPA (Bi et coll., 1997). Mushley et collaborateurs ont par ailleurs mis en évidence qu'une hydrolyse partielle du récepteur AMPA survient lors de la potentialisation des neurones de l'hippocampe maintenus en culture. Au niveau des études de liaison, le traitement de coupes minces de cerveaux de rat par la calpaïne est associé à une hausse sélective de liaison de ^3H -AMPA à son récepteur (Bi et coll., 1997; Bi et coll., 1994; Tocco et coll., 1992a). Cette dernière

observation n'est sûrement pas sans intérêt si l'on considère que l'apparition de la LTP dans la région hippocampale est aussi caractérisée par une hausse de la liaison du ^3H -AMPA.

1.8.1.3 Les phospholipases.

L'activation des phospholipases membranaires représente une composante importante des effets de certains neurotransmetteurs. En hydrolysant divers phospholipides, ces enzymes seraient en mesure d'entraîner des modifications de l'environnement lipidique de la membrane (Zwaal et coll., 1989), influençant ainsi les caractéristiques fonctionnelles et structurales de plusieurs types de récepteurs (Loh et Law, 1980). Par conséquent, il fut proposé que l'activation des phospholipases dépendantes du calcium, représenterait un mécanisme cellulaire potentiel dans la formation de la LTP (Chabot et coll., 1998; Baudry et Massicotte, 1992; Massicotte et coll., 1991; Lazarewicz et coll., 1988). Par exemple, il a été démontré que le traitement de membranes synaptiques (Massicotte et Baudry, 1990), de synaptoneurosomes (Chabot et coll., 1998) et de coupes minces de cerveaux de rat (Tocco et coll., 1992c) par des phospholipases dépendantes du calcium génère une hausse spécifique de la liaison au récepteur AMPA tout comme celle observée après l'apparition de la LTP. Dans cette optique, diverses études ont révélé que les inhibiteurs préférentiels de la phospholipase A_2 (PLA_2) s'opposent à la formation de la LTP (Bernard et coll., 1994; Massicotte et coll., 1990; Okada et coll., 1989), alors que l'activation endogène de cette même enzyme par la mellétine (un activateur potentiel de phospholipases) produit une augmentation sélective de la liaison au récepteur AMPA (Bernard et coll., 1995). L'importance de ce mécanisme de régulation du récepteur AMPA par une phospholipase fut

confirmée par diverses études à caractère neurodégénératif. En effet, le laboratoire du Dr Massicotte a mis en évidence au cours des dernières années que la capacité de la PLA₂ à moduler le récepteur AMPA était grandement affectée dans des situations pathologiques reconnues pour interférer avec l'apparition de la LTP comme lors de l'épilepsie (Massicotte et coll., 1991). Les mécanismes intimes de la régulation du récepteur AMPA par la PLA₂ demeurent à préciser. Toutefois, il semblerait que cette modulation ne soit pas le résultat de l'action endogène des métabolites formés à partir des lipides membranaires suivant l'activation de la PLA₂ (Massicotte et Baudry, 1990). Des données biochimiques obtenues récemment, portent plutôt à croire qu'une modification de l'environnement phospholipidique du récepteur, en particulier concernant la phosphatidylsérine, serait responsable des effets observés sur la liaison du récepteur AMPA (Gagné et coll., 1996; Baudry et coll., 1991) (**Figure 8**).

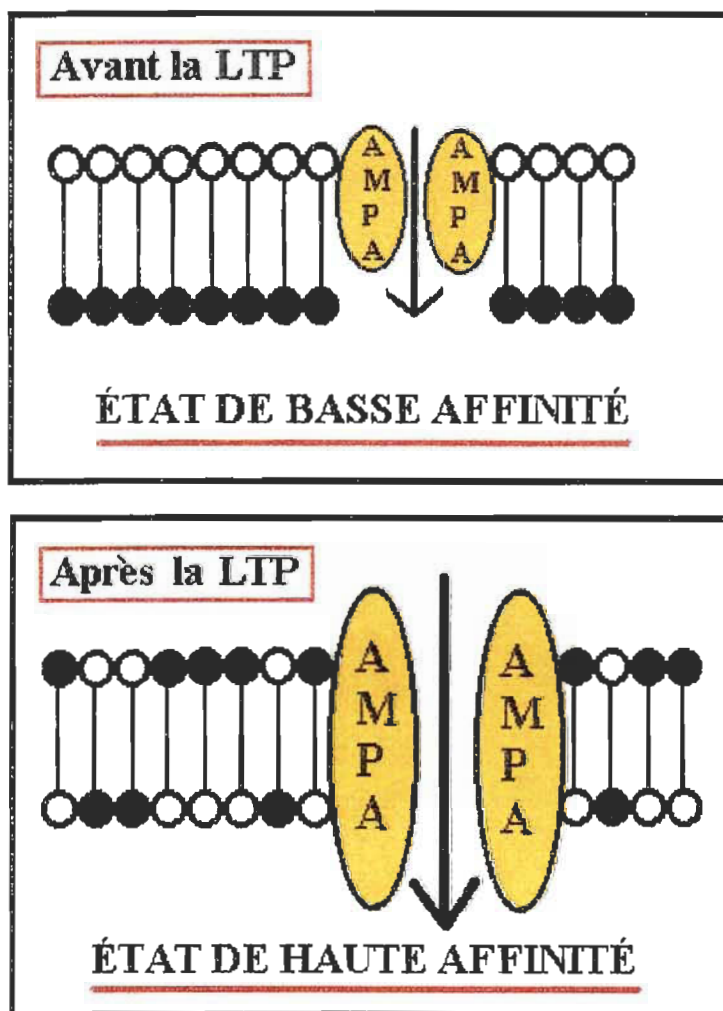


Figure 8 : Illustration montrant l'état du récepteur avant et après la LTP. Il est à noter qu'une modification de l'environnement lipidique du récepteur AMPA serait responsable d'une hausse de son affinité dans le maintien de la LTP.

1.9 Enrichissement cognitif, diabète et mémoire

1.9.1 Enrichissement cognitif

Au cours des dix dernières années de nombreux modèles animaux ont été utilisés pour étudier les liens existants entre le comportement cognitif et les altérations électrophysiologiques des neurones du cerveau (Moser et coll., 1993; Tocco et coll., 1992b; Shors et Dryver, 1992). Par exemple, plusieurs modèles de souris transgéniques, surexprimants ou déficientes en certains processus enzymatiques, ont permis de révéler l'importance des protéines kinases dans le maintien de la LTP retrouvée dans l'hippocampe (Bach et coll., 1995; Abeliovich et coll., 1993; Akers et coll., 1986). Bien sûr, l'avantage à utiliser ces animaux modifiés génétiquement repose sur la caractérisation d'un système enzymatique spécifique potentiellement impliquée dans le phénomène de la plasticité neuronale. Cependant, ces modèles animaux transgéniques ne permettent pas de vérifier les aspects biochimiques et électrophysiologiques de la LTP dans un contexte complexe d'interaction enzymatique. Par conséquent, nombreux sont les chercheurs à avoir utilisés des modèles animaux dans lesquels les modifications de la transmission neuronale ont été étudié (Waters et coll., 1997; Moser et coll., 1993; Robinson et Racine, 1982). En effet, il a été démontré que certaines formes d'hébergement des rats de laboratoire permettent d'augmenter les capacités d'apprentissage de ces animaux, un effet qui semble lié à des perturbations moléculaires spécifiques. En particulier, une hausse du niveau d'expression pour les récepteurs de la neurotrophine-3 et pour ceux des glucocorticoïdes a été démontré chez les animaux enrichis (Torasdotter et coll., 1996; Olson et coll., 1994). Évidemment, un

tel modèle comportemental est avantageux par rapport aux animaux transgéniques compte tenu que les modifications biochimiques liées à une hausse des performances cognitives sont observées sans manipulations moléculaires préalables. Étant donné l'importance des récepteurs glutamatergiques dans la formation de la mémoire, il est donc surprenant de constater qu'aucune étude biochimique ne fut réalisée pour identifier la contribution de ces récepteurs (et de leur régulation) lors de l'enrichissement cognitif. En fait, les deux premiers manuscrits qui composent cette thèse sont dédiés à l'analyse de perturbations d'ordre glutamatergique chez l'animal enrichi.

1.9.2 Diabète

L'apparition d'une hyperglycémie liée au développement du diabète mellitus provoque l'avènement de certains troubles fonctionnels cérébraux. En effet, cette maladie est associée à une perturbation des performances cognitives chez le rat, dont d'importants troubles de mémoire (Biessels et coll., 1996; Flood et coll., 1990). D'autres travaux, allant dans le même sens, se sont basés sur l'analyse du comportement cognitif chez les individus atteints de diabète mellitus. Les résultats obtenus montrent bien une diminution d'efficacité dans la rétention de l'information chez les individus diabétiques (Mooradian et coll., 1988; Ryan et coll., 1985). De façon parallèle, certains chercheurs ont démontré que le diabète mellitus induit par la streptozotocine (une drogue détruisant les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas) entraîne des problèmes cognitifs chez la souris du même ordre que ceux observés chez les gens souffrants du même type de diabète (Biessels et coll., 1996; Flood et coll., 1990). Plus récemment, Biessels et collaborateurs ont démontré en 1996 que

les rats traités à la streptozotocine ont de sérieux problèmes à réaliser des tâches d'ordre visuo-spatiales, lesquelles nécessitent pour ce faire une participation de la structure hippocampale. Cependant, les causes cellulaires d'un tel désordre cognitif chez les animaux diabétiques demeurent toujours à déterminer. C'est pourquoi, le troisième et le quatrième manuscrit inclus dans le présent document s'attardent aux perturbations électrophysiologiques et biochimiques des récepteurs au glutamate potentiellement retrouvées chez les animaux traités à la streptozotocine.

2. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Dans le cadre de notre introduction générale, nous avons tenté de mettre en évidence l'importance que joue la potentialisation neuronale (LTP) dans le stockage de l'information. De plus, nous avons positionné les différentes hypothèses cellulaires susceptibles de contribuer à l'apparition et au maintien de la LTP dans des modèles *in vitro*. En scrutant étroitement la littérature scientifique, on note depuis quelques années l'intérêt que portent les chercheurs en neurobiologie pour l'hypothèse postsynaptique en regard du maintien de la LTP. Pour les biochimistes du cerveau il existe fort probablement un lien entre l'altération des récepteurs AMPA pour le glutamate et l'expression de la LTP dans la région hippocampale. Dans une perspective globalisante, il est certes raisonnable de proposer que les conditions physiologiques connues pour affecter les fonctions mnésiques des individus peuvent être accompagnées de modifications biochimiques des récepteurs AMPA pour le neuromédiateur glutamate. Dans le cadre de cette thèse, nous avons tenté de définir, et ce par l'utilisation de différents modèles animaux, comment des modifications dans les fonctions cognitives interfèrent avec les mécanismes électrophysiologiques et biochimiques de la LTP.

Le premier volet de ce travail de doctorat vise essentiellement à établir si le niveau de LTP et le degré de liaison du récepteur AMPA sont modifiés dans les cerveaux de rats ayant été soumis à un environnement susceptible de favoriser le développement des capacités d'apprentissage. Le deuxième volet de cette étude portera, pour sa part, sur l'impact du diabète mellitus en regard du développement de la LTP et de la modulation des propriétés

biochimiques des récepteurs glutamatergiques (NMDA et AMPA). Cet intérêt pour le diabète repose essentiellement sur les diverses observations scientifiques montrant que cette affection à caractère métabolique peut provoquer des dérèglements importants dans la capacité du cerveau à stocker de nouvelles informations (Biessels et coll., 1996; Flood et coll., 1990).

Pour établir les rapports existant entre les propriétés biochimiques et électrophysiologiques de la mémorisation, on ne saurait se limiter à une seule approche expérimentale. Par exemple, pour les électrophysiologistes il existe obligatoirement une relation directe entre la capacité des neurones à communiquer leur influx électrique et le contrôle des fonctions cognitives. Dans cette optique, nous allons tout d'abord vérifier si les enregistrements électrophysiologiques de nature glutamatergique sont affectés, tant par l'enrichissement cognitif que le diabète mellitus chez le rat. Ces enregistrements électrophysiologiques seront effectués dans certaines régions de l'hippocampe, nous le rappelons, une structure essentielle à la consolidation des informations. De plus, une emphase particulière sera portée sur la capacité de cette région du cerveau à produire la LTP dans ces deux modèles expérimentaux.

D'un point de vue biochimique, nous tenterons de définir de quelle façon des modifications dans les propriétés de liaison des récepteurs au glutamate sont liées à des perturbations des fonctions cognitives. Ici, la technique d'autoradiographie quantitative sera exploitée afin d'identifier les structures du cerveau les plus vulnérables à des changements biochimiques des récepteurs au glutamate. Par ailleurs, la préparation de synapses

fonctionnelles en suspension (ou synaptoneurosomes) offrira la possibilité d'identifier les systèmes enzymatiques impliqués dans la modulation des récepteurs glutamatergiques dans nos divers modèles expérimentaux. Finalement, l'hybridation *in situ* et le transfert de type Western (ou Western blot) constitueront des approches expérimentales de premier choix afin de cibler les causes moléculaires des dérèglements glutamatergiques au niveau des récepteurs. À long terme, nous espérons par ces travaux identifier les bases cellulaires endogènes de la régulation de l'activité neuronale dans diverses conditions connues pour affecter les fonctions cognitives.

CHAPITRE 2

Première partie

**Mechanism of altered synaptic strength due to
experience: relation to long term potentiation**

Article publié dans

Brain Research 736 (1996) 243-250

Résumé du deuxième chapitre

Tel que rapporté dans l'introduction, la potentialisation à long terme (LTP) constitue un modèle expérimental d'apprentissage et de mémorisation couramment utilisé en laboratoire pour l'étude des bases biochimiques de la formation des souvenirs. Par contre, le lien existant entre ce phénomène de plasticité neuronale reproduit en laboratoire et le comportement chez l'animal demeurerait à préciser. Pour ce faire, nous avons exposé des animaux, en l'occurrence des rats, à un environnement complexe et enrichissant afin de stimuler leurs fonctions cognitives. Le but de cette manipulation comportementale était de provoquer l'apparition d'une LTP endogène dans l'hippocampe de ces animaux. Le premier manuscrit du présent chapitre démontre que l'enrichissement cognitif induit l'apparition d'une certaine forme de LTP semblable à celle reproduite en laboratoire au niveau du Gyrus Dentatus de l'hippocampe du rat. De façon plus précise, les données rapportées montrent l'existence de similitudes électrophysiologiques et biochimiques avec la LTP reproduite *in vitro*. En effet, nous avons observé que l'enrichissement cognitif s'oppose au développement de la LTP en laboratoire suggérant ainsi la présence endogène de ce phénomène saturable. D'un point de vu biochimique nous avons rapporté une augmentation de l'affinité des récepteurs AMPA au niveau de l'hippocampe des animaux enrichis tout comme celle observée dans le développement de la LTP *in vitro*. Dans l'ensemble, les modifications électrophysiologiques et biochimiques des récepteurs AMPA, constatées chez les rats enrichis, permet de proposer l'existence d'un lien entre la LTP reproduite *in vitro* et le comportement chez l'animal. Cependant, les mécanismes cellulaires et/ou moléculaires responsables de ces perturbations d'ordre glutamatergique demeuraient à déterminer.

Certaines études moléculaires ont démontré que le niveau d'expression d'ARNm pour la neurotrophine-3 et les glucocorticoïdes est augmenté chez les animaux enrichis. Par conséquent, il serait envisageable que l'enrichissement cognitif puisse entraîner un changement du niveau d'expression des différentes sous-unités du récepteur AMPA et contribuer à altérer les propriétés fonctionnelles de ce dernier. Toutefois, les résultats de biologie moléculaire obtenus dans le second manuscrit n'indiquent aucun changement d'expression pour les différentes sous-unités du récepteur AMPA dans l'hippocampe des animaux enrichis.

Dans le passé, il a été observé que le traitement de coupes minces de cerveaux de rats, par du calcium et de la phosphatidylsérine (PS), provoque une hausse d'affinité des récepteurs AMPA identique à celle retrouvée dans le maintien la LTP *in vitro*. De façon pertinente, nous avons évalué l'effet d'un traitement similaire sur des coupes de cerveaux enrichis. Les résultats obtenus dans notre laboratoire montrent une perte de capacité à moduler le récepteur AMPA, suivant un traitement avec du calcium et de la PS, sur des coupes minces de cerveaux de rats enrichis. Cette perte de modulation des récepteurs AMPA sous ces conditions indique que les processus cellulaires impliqués dans l'enrichissement cognitif et la LTP *in vitro* agissent probablement à travers des mécanismes enzymatiques communs. Finalement, nos résultats supportent l'hypothèse voulant qu'une perturbation de l'environnement lipidique du récepteur AMPA soit importante pour réguler les propriétés fonctionnelles de ce dernier.

Mechanism of altered synaptic strength due to experience: relation to long-term potentiation

T.C. Foster ^{a,*}, J. Gagné ^b, G. Massicotte ^{b,c}

^a Department of Psychology, University of Virginia,
Charlottesville, USA, VA 22903

^b Département de Chimie-Biologie, Université du Québec à Trois-Rivières,
C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7

^c Centre de recherche de l'Institut Philippe Pinel,
Montréal, Québec, Canada, H1C 1H1

Keywords: Hippocampus; Long-term potentiation; Postsynaptic; Glutamate receptor binding; Environmental enrichment; Memory

Sends proofs and correspondence to:

Thomas C. Foster
Department of Psychology
University of Virginia
Charlottesville, VA
USA, 22903
Phone: (804) 982-4731
Fax: (804) 924-7185
TCF5A@Virginia.EDU

Abstract

An increase in medial perforant synaptic strength can be observed for hippocampal slices from rats exposed to environmental enrichment. The expression of enhanced strength exhibits properties similar to long-term potentiation (LTP, a physiological model of memory storage. Similarities include an increase in strength to the synaptic response in the absence of an altered paired-pulse ratio and an increase in the binding of the glutamate agonist α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate. Furthermore, environmental enrichment interacts with the mechanisms responsible for the induction of LTP by inhibiting further increases in synaptic strength following LTP-inducing stimulation. The results provide evidence for experience-mediated influences on postsynaptic mechanisms regulating medial perforant path synaptic strength.

Introduction

Long-term potentiation (LTP) is an increase in synaptic transmission induced by high frequency stimulation. Considerable interest in LTP has been generated due to the characteristics of LTP which suggest a possible link to memory storage processes. Utilization of the in vitro hippocampal slice preparation has facilitated examination of synaptic plasticity at several hippocampal synapses and provided evidence for diverse forms of LTP based on the necessity for postsynaptic N-methyl-D-aspartate glutamate receptor (NMDAR) activation and the mechanism for expression of augmented responses [3,4,16,17,43]. Differences in the ratio of paired-pulse responses following induction of LTP have been used to suggest that expression of the various forms of LTP differ in terms of presynaptic transmitter release mechanisms [4,43]. The expression of the NMDAR-dependent form of LTP is not associated with an altered paired-pulse ratio, but is thought to involve another postsynaptic glutamate receptor, the ionotropic agonist α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) receptor. Evidence for postsynaptic modifications has been provided on the basis of increased responsiveness to exogenous application of AMPA, and from studies employing quantal analysis [8,12,22,23]. In particular, recent studies have shown that LTP expression may involve the uncovering of functional AMPA receptors that, prior to LTP induction, were either not present in the postsynaptic membrane or were silent [18,20]. This notion which assumes the appearance of new functional AMPA receptors during LTP, is consistent with previous observations indicating that LTP formation in rat hippocampus is associated with increased binding of [3 H]AMPA to glutamate/AMPA receptors [24,25,40]. While extensive advancements have been made in

discerning the mechanisms for induction and expression of LTP, the endogenous occurrence of LTP due to normal cell activity remains one of the major unresolved issues [2]. Growth of hippocampal synaptic responses is observed in behaving animals under conditions associated with differential experience [9,29,35]. However, results are complicated by changes in behavioral state and modifications in synaptic transmission due to extrahippocampal influences [29,33]. It is, therefore, of special interest that rats which are repeatedly exposed to stimulus-rich versus stimulus-poor environments exhibit increased perforant path excitatory postsynaptic potentials (EPSPs) recorded in vitro from hippocampal slices [14]. Utilization of the hippocampal slice preparation permits examination of the mechanisms for expression of synaptic strength preserved from extrahippocampal influences. The present study examines biochemical and electrophysiological mechanisms for in vitro expression of increased synaptic strength associated with environmental enrichment and tests the hypothesis that the endogenous growth of synaptic strength interacts with mechanisms for LTP expression.

Materials and methods

Differential housing procedures

At 36–45 days of age, male Sprague-Dawley rats from the same litter were randomly assigned to either environmentally-complex housing (EC) (n=30) or individual cages (IC) (n=30). The IC animals were individually housed in wire cages (25 X 18 X 21 cm) and only handled for routine upkeep. The EC rats were group housed (three rats per cage) and several three-dimensional objects were placed in the cage (25 X 18 X 66 cm). Each day, EC animals were allowed 1–6 h to explore one of several novel environments, usually a large box, recording cage, or empty maze pool. Several three-dimensional objects were placed in the environment, along with rat chow and a water bottle. Following 4–5 weeks of differential housing, animals were sacrificed for examination of electrophysiology and receptor binding assays.

Electrophysiology

Rats were deeply anesthetized with methoxyflurane (Metofane) before decapitation and the brains were rapidly removed and placed in oxygenated media. Hippocampal slices (450–500 μ m) were prepared using a gravity driven tissue chopper, then transferred to a standard recording chamber and perfused (1 ml/min) at 31–32°C with oxygenated media containing (in mM): NaCl 124, KCl 2, KH₂PO₄ 1.25, MgSO₄ 2, CaCl₂ 2, NaHCO₃ 26, dextrose 10. Humidified gas mixture (95% O₂/5% CO₂) was continuously blown over the slices. In the case of EC animals, sacrifice was on the day following final exposure to the novel environments. All slices were obtained at the same time of day during the dark phase of the

animal's light/dark cycle in order to minimize circadian influences on physiology. Extracellular field potentials were recorded with glass micropipettes (4-6 M Ω) filled with slice media. Stimulating electrodes consisted of a pair of insulated platinum-iridium wires with the tips exposed. Stimulating electrodes were placed approximately 1 mm from the recording electrode in the middle of the molecular layer of the fascia dentata. The signals were amplified, filtered between 1 Hz and 1 kHz and stored on computer disk for off-line analysis.

To examine differences in baseline synaptic strength between EC (n=12) and IC (n=12) animals, input-output (IO) curves of synaptic responses were constructed using the averaged response at eight stimulus intensities. Stimulation consisted of paired-pulse (50 ms interpulse interval) of constant current (100 μ s, 0.1 Hz). Paired-pulses were delivered at a rate of 0.2 Hz and stimulus intensity was systematically varied by first identifying the threshold to evoke an EPSP then multiplying this intensity by 1.33 and repeating this procedure for seven subsequent stimulus levels. Threshold was defined as the stimulation intensity that elicited a response for the first pulse at least 50% of the time. Five responses were acquired at each level during an ascending stimulation series and five more at each level for the same stimulus intensities during a descending series. The maximum slope of the descending portion of the EPSP was extracted by a computer program (Data-Wave) using linear regression. The ten slope measures for each stimulus level were averaged and used as the data points for analysis of baseline synaptic strength. The paired-pulse ratio at each stimulus level was calculated as the ratio of the mean slope for test and conditioning pulses (i.e. second pulse/first pulse). In

order to insure that IO data were acquired from healthy slices, input-output curves were taken from a minimum of three slices per animal and the IO curve that exhibits the largest EPSP slope to the conditioning pulse at the highest stimulation intensity level was selected for subsequent analysis. The data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) for repeated measures designs.

To examine the influence of differential experience on induction of LTP, hippocampal slices were prepared from a separate group of EC (n=10) and IC (n=10) animals. Stimulation intensity was set to evoke an EPSP amplitude of 1-2 mV and stimulation was delivered at a rate of 0.033 Hz. After collection of a stable baseline for at least 10 min, two bursts of high frequency stimulation (100 pulses at 100 Hz) was delivered with 10 s between bursts and responses were collected for an additional 20 min at the baseline stimulation rate. The slope of the EPSP was measured for each response. Slope measures were then normalized to the mean slope of the last 10 min of baseline recording and multiplied by 100. Thus, changes in EPSP slope were expressed as a percent of baseline. The percent change in EPSP slope was averaged across the 15-20 min following LTP-inducing stimulation to provide an estimate of the magnitude of LTP for each slice. Data were collected from 2-4 slices per animal and the estimates of LTP magnitude were averaged across slices per animals and used as data points for comparison by an ANOVA.

Binding assays

For ligand binding studies, animal (EC: n=8, IC: n=8) were differentially housed for 4 weeks prior sacrifice. Brain were rapidly removed, frozen in -20°C isopentane, and stored at

-70°C until sectioning on a cryostat. Sections were thawed at room temperature and preincubated in Tris-acetate buffer (100 mM, pH 7.4) containing 100 µM EGTA for 60 min at 35°C. After a rapid ice-cold Tris-acetate buffer wash, sections were incubated with radioactive ligands. For radioactive α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate ($[^3\text{H}]\text{AMPA}$) binding, sections were incubated for 45 min at 0-4 °C in Tris-acetate buffer (50 mM, pH 7.4), containing 100 µM EGTA, 50 mM potassium thiocyanate and 100 nM $[^3\text{H}]\text{AMPA}$ (specific activity 60 Ci/mM; NEN-Dupont). Non-specific binding was obtained in the presence of 1 mM quisqualate. Sections were rinsed twice in incubation buffer for 10 s, once for 5 s in 50% of the same buffer followed by three dips in distilled water, dried under a stream of warm air, then used for autoradiography. Radioactive 6-cyano-7-nitroquinoxaline (CNQX) (29.0 Ci/mM; NEN-Dupont) binding was assessed with the same procedure except that 100 µM glycine was included in the incubation to inhibit CNQX binding to glycine sites of the NMDAR. The $[^3\text{H}]\text{CNQX}$ concentration was 35 nM and potassium thiocyanate was not included in the incubation.

For $[^3\text{H}]\text{glutamate}$ binding to NMDA receptors, sections were incubated with 100 nM $[^3\text{H}]\text{glutamate}$ (51 Ci/mmol, NEN-Dupont) for 45 min at 0-4 °C in Tris-acetate buffer (50 mM, pH 7.4; 50 µM EGTA) containing 5 µM AMPA, 1 µM kainic acid and 10 µM quisqualate to eliminate glutamate binding to non-NMDA receptor sites and 100 µM 4-acetanido-4'-isothiocyanato-stilbene-2,2'-disulfonic acid to block glutamate uptake sites. Non-specific binding was defined as the binding measured in the presence of 1mM glutamate. Sections were rinsed twice in incubation buffer for 15 s, once for 5 s in 50% of

the same buffer followed by three dips in distilled water. Sections were then dried for autoradiography.

For autoradiography, dried sections and tritium standards (Amersham, microscales) were exposed to tritium sensitive film (Amersham, Hyperfilm) for 7 days ($[^3\text{H}]\text{AMPA}$ and $[^3\text{H}]\text{CNQX}$) or 14 days ($[^3\text{H}]\text{glutamate}$). Densitometric measurements were performed with a microcomputer-based image analysis system (Imaging Research, MCID). Images were digitized, shade corrected and visualized in black and white. Standardization curves derived from ^3H -standards were used to convert gray level reading into pmol/mg of protein. The mean optical density was measured from 6-8 sections per region, per rat. For each condition, specific binding was obtained by subtracting non-specific from total binding. The specific binding was averaged across sections for each region, per rat. The means were used as data points subjected to an ANOVA between the two groups for each area examined.

Results

Electrophysiology

Representative examples of synaptic responses elicited by paired-pulse stimulation of the medial perforant path of an EC animal are illustrated in Fig. 1. Stimulation of the medial perforant path in a short latency negative EPSP recorded in the middle third of the outer molecular layer. For all slices in which the medial perforant path was activated, the ratio of EPSP slope for paired-pulse stimulation intensities above threshold was less than one. A paired-pulse ratio less than one is defining characteristic of the medial perforant path [6,26].

The threshold stimulation intensity was similar for the two groups (IC: 68.98 ± 12.08 μ A; EC: 58.08 ± 9.21 μ A; mean $\pm$ S.E.M). The mean stimulus intensities for the eight stimulation levels of the IO curve employed for each group are illustrated on the x-axis of Fig. 2. A repeated-measures ANOVA on stimulation intensity across the eight stimulus levels indicated no difference between the two groups. Despite the similarity in stimulation intensity, an ANOVA of EPSP slope across the eight stimulus levels indicated a significant effect of the treatment ($F(1,176) = 4.24$, $P < 0.04$), such that larger synaptic responses were observed for EC animals (Fig. 2A). The ratio of the EPSP slopes for the first level stimulation was close to one as expected for stimulation near the threshold for eliciting a response [11]. As the stimulation intensity increased, the paired-pulse ratio for both groups decreased to less than 1. A repeated-measures ANOVA on the paired-pulse ratio across the eight stimulus levels of the IO curve indicated no effect of differential experience on presynaptic function (Fig. 2B).

To determine whether environmental enrichment interacts with mechanisms regulating LTP-induction, we attempted to induce LTP at medial perforant path synapses of EC (n=10) and IC (n=10) animals. An ANOVA on the baseline EPSP slope prior to high frequency stimulation indicated no difference between the two groups. Following collection of baseline responses, high frequency was delivered to induce LTP and responses were monitored for another 20 min after tetanus. An ANOVA on the magnitude of LTP observed during the 15-20 min post-LTP-induction indicating a significant effect of the treatment conditions ($F(1,19) = 8.48, P < 0.01$) such that the magnitude of LTP was decreased for EC animals ($107 \pm 3\%$ of baseline) relative to IC animals ($122 \pm 4\%$) (Fig. 3).

Binding assays

Several recent studies indicate that changes in the binding properties of AMPA receptors may represent an important component of synaptic plasticity. Fig. 4 illustrates typical autoradiograms obtained from EC (right) and IC (left) animals and the level of [^3H]AMPA binding for the various brain regions examined. For quantitative analysis, the hippocampus was subdivided into CA1 and CA3 regions as well as the molecular layer of the dentate gyrus. The CA1 and CA3 regions were further subdivided into stratum radiatum (RAD) and stratum oriens (OR). Other areas of interest included the outer layers (I-II) and inner layers (III-IV) of the parieto-temporal cortex (EXTCX and INTCX), the neostriatum (STRIA), the molecular and granular layers of the cerebellum (MOL and GRAN) and the thalamic nuclei (THAL). A series of ANOVAs on the level of [^3H]AMPA binding for the various regions indicated a significant increase in binding for EC relative to IC animals

confined to hippocampal regions CA3 radiatum ($F(1,15) = 13.31$, $P < 0.005$), CA3 oriens ($F(1,15) = 25.00$, $P < 0.0005$), CA1 radiatum ($F(1,15) = 15.43$, $P < 0.0005$), CA1 oriens ($F(18.97)$, $P < 0.001$), and the molecular layer of the dentate gyrus ($F(1,15) = 24.24$, $P < 0.0005$). The quantitative analysis is shown in Fig. 5A and emphasizes that the increase in binding was uniformly distributed throughout the hippocampus. No significant difference in [^3H]AMPA binding could be found in the cortex, cerebellum, neostriatum, and thalamic nuclei, indicating that [^3H]AMPA binding changes were specific to the hippocampus and not generalized throughout the brain. In contrast to the increase in AMPA receptor binding for the various hippocampal regions, enrichment was not associated with altered binding of [^3H]CNQX (Fig. 5B) or the binding of [^3H]glutamate to the NMDA receptor (Fig. 5C). The effects of enrichment on the binding properties of AMPA and NMDA subtypes of glutamate receptors in various fields of the hippocampus are summarized in Fig. 6.

Discussion

The hippocampal slice preparation permits examination of experience-related changes in synaptic function preserved from extrahippocampal influences. In the present study, environmental enrichment was associated with increases in medial perforant path synaptic strength, no change in paired-pulse interactions, a specific increase in hippocampal AMPA binding and inhibition of LTP induction.

In addition to confirming the finding of Green and Greenough [14], that increased perforant path synaptic strength in slices of animals exposed to enriched conditions, the present study demonstrated that this increase was not associated with a change in the medial perforant path paired-pulse ratio. Previous research indicates that the paired-pulse ratio for medial perforant path synapses is not altered following induction of LTP [27]. The absence of a decrease in the paired-pulse ratio following induction of NMDAR-dependent LTP has been used as evidence to suggest that expression of LTP is not due to the same presynaptic mechanisms that underlie short-term plasticity and NMDAR-independent LTP [4,43].

Electrophysiological studies of mechanisms for expression of NMDAR-dependent LTP indicate that the increase in synaptic strength is due, at least in part, to a change in the component of synaptic transmission mediated by AMPA sensitive receptors [8,12,22,23]. This modification may be variously expressed as an increase in the number of binding sites, an increase in the binding affinity, or a change in the kinetics of the AMPA receptor complex [1,24,25,34,40]. In this respect, recent studies indicate that some proportion of the excitatory synapses of hippocampal CA1 pyramidal cells express NMDA receptors in the

absence of functional AMPA receptor [18,20]. The absence of an AMPA response renders these synapses silent at the resting membrane potential. It has been proposed that when these silent synapses are subjected to high frequency stimulation to induce LTP, the synapses acquire AMPA-type responses due to the functional addition of AMPA receptors. The increased AMPA receptor binding in the absence of altered [³H]CNQX and NMDAR binding observed in the present study suggests that the enhanced synaptic response of enriched animals is largely due to a change in receptor affinity. This interpretation is consistent with previous observations that increased affinity of AMPA receptors is associated with an increase in the physiological response elicited by the endogenous transmitter in hippocampal slices [34]. However, the possibility that synaptic plasticity is associated with the appearance of new receptors and possibly new synapses, cannot be ruled out. Maren et al. [24], using a sensitive saturation analysis, reported an increased CNQX binding following perforant path LTP induction in vivo, indicating a possible increase in the number of AMPA receptors. Furthermore, an increase in CA1 spine density following environmental enrichment has been reported, suggesting that at least for region CA1, enrichment could result in the formation of new hippocampal synapses [30]. Regardless of the exact mechanism, these results are consistent with the hypothesis that changes in AMPA receptor properties are critical for the increase in synaptic strength associated with enrichment and LTP.

The similarities in expression of LTP and enrichment-related synaptic enhancement indicate that an LTP-like increase in synaptic strength could be a naturally occurring state as

a consequence of the animals previous history of experience. Furthermore, the inhibition of LTP induction observed in animals exposed to environmental enrichment suggests that the physiological changes associated with differential experience interact with mechanisms that regulate induction of LTP. The environmental conditions that alter hippocampal synaptic function may provide an important clue to the role of synaptic plasticity in behavior. A major question involving this interaction concerns the degree to which different aspects of the enrichment treatment are responsible for synaptic growth. For instance, one might argue that the reduction in LTP observed in enriched animals is not associated with behavioral learning per se, but rather due to stress-related responses generated by the novelty of the enrichment condition. In this respect, reduction in the magnitude of LTP in area CA1 of hippocampal slices and an increase in AMPA binding in various regions of the hippocampus have been reported following acute stress [13,37,39,41]. Furthermore, various reports indicate that hippocampal synaptic plasticity is impaired when stress-related glucocorticoid levels are unduly high or low [10,19,32,38]. However, glucocorticoid either decrease or have negligible effects on receptor binding throughout the hippocampus [5,15,19,32]. While reduced synaptic plasticity may result from stress-related hormones, it should be noted that acute exposure to a novel environment also produced an increase in perforant path synaptic strength, an effect that does not appear to result from changes in arousal or stress [29]. Similarly, acquisition of a classically conditioned response has been correlated with changes in the discharge activity of hippocampal units and associated with increased AMPA binding in the hippocampus [42]. The increase binding was specific for pairing of the conditioned and unconditioned stimuli and was independent of restraint stress. Finally, if the influence of

enrichment on the hippocampus is the result of stress, then one would predict that both conditions should have similar influences on spatial behaviors which depend on an intact hippocampus [28,31]. Previous studies have shown that stress can impair spatial learning in rats, while enrichment appears to improve learning ability on a spatial task [21,30,36]. Taken together, these results indicate that the increase in synaptic strength observed after extended environmental enrichment is not due to stress alone and may represent a mechanism regulating the transmission properties through the hippocampus during information processing.

In conclusion, the present study supports the hypothesis that experience-mediated hippocampal synaptic plasticity is linked to mechanisms for LTP expression. In conjunction with previous research demonstrating an increase in AMPA receptor binding following the induction of LTP, the present results indicate a critical role for AMPA receptors in the expression of enhanced synaptic responses of enriched animals. The finding that LTP in the medial perforant path of the dentate gyrus is decreased in enriched rats suggest that the two manipulations (i.e. LTP and enrichment) act on the same biochemical variables. Further research will determine which cellular processes are responsible for regulating synaptic strength during environmental enrichment and LTP.

References

- [1] Bernard, J., Lahsaini, A. and Massicotte, G., Potassium-induced long-term potentiation in area Ca1 of the hippocampus involves phospholipase activation, *Hippocampus*, 4 (1994) 447-453.
- [2] Bliss, T.V. and Collingridge, G.L., A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus, *Nature*, 361 (1993) 31-39.
- [3] Bramham, C.R., Milgram, N.W. and Srebro, B., Activation of AP-5 sensitive NMDA receptors is not required to induce LTP of synaptic transmission in the lateral perforant pathway, *Eur. J. Neurosci.*, 3 (1991) 1300-1308.
- [4] Christie, B.R. and Abraham, W.C., Differential regulation of paired-pulse plasticity following LTP in the dentate gyrus, *Neuroreport*, 5 (1994) 385-388.
- [5] Clark, A.S. and Cotman, C.W., Adrenal hormone effects on hippocampal excitatory amino acid binding, *Brain Res.*, 585 (1992) 161-168.
- [6] Colino, A. and Malenka, R.C., Mechanisms underlying induction of long-term potentiation in rat medial and lateral perforant paths in vitro, *J. Neurophysiol.*, 69 (1993) 1150-1159.
- [7] Collingridge, G.L., Kehil, S.J. and McLennan, H., Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus, *J. Physiol. (Lond.)*, 334 (1983) 33-46.

- [8] Davies, S.N., Lester, R.A., Reymann, K.G. and Collingridge, G.L., Temporally distinct pre- and post-synaptic mechanisms maintain long-term potentiation, *Nature*, 338 (1989) 500-503.
- [9] Deadwyler, S.A., West, M.O., Christian, E.P., Hampson, R.E. and Foster, T.C., Sequence-related changes in sensory evoked potentials in the dentate gyrus: A mechanism for item-specific short-term information storage in the hippocampus, *Behav. Neural Biol.*, 44 (1985) 201-212.
- [10] Diamond, D.M., Bennett, M.C., Fleshner, M. and Rose, G.M., Inverted-U relationship between the level of peripheral corticosterone and the magnitude of prime burst potentiation, *Hippocampus*, 2 (1992) 421-430.
- [11] Dumas, T.C. and Foster, T.C., Developmental increase in CA3-CA1 presynaptic function in the hippocampal slice, *J. Neurophysiol.*, 73 (1995) 1821-1828.
- [12] Foster, T.C. and McNaughton, B.L., Long-term synaptic enhancement in CA1 is due to increased quantal size, not quantal content, *Hippocampus*, 1 (1991) 79-91.
- [13] Foy, M.R., Stanton, M.E., Levine, S. and Thompson, R.F., Behavioral stress impairs long-term potentiation in rodent hippocampus, *Behav. Neural Biol.*, 48 (1987) 138-149.
- [14] Green, E.J. and Greenough, W.T., Altered synaptic transmission in dentate gyrus of rats reared in complex environments: evidence from hippocampal slices maintained in vitro, *J. Neurophysiol.*, 55 (1986) 739-750.
- [15] Halpain, S. and McEwen, B.S., Corticosterone decreases [³H]glutamate binding in rat hippocampal formation, *Neuroendocrinology*, 48 (1988) 235-241.

- [16] Harris, E.W. and Cotman, C.W., Long-term potentiation of guinea pig mossy fiber responses is not blocked by N-methyl-D-aspartate antagonists, *Neurosci. Lett.*, 70 (1986) 132-137.
- [17] Harris, E.W., Ganong, A.H. and Cotman, C.W., Long-term potentiation in the hippocampus involves activation of N-methyl-D-aspartate receptors, *Brain Res.*, 323 (1984) 132-137.
- [18] Isaac, J.T.R., Nicoll, R.A. and Malenka, R.C., Evidence for silent synapses: Implications for the expression of LTP, *Neuron*, 15 (1995) 427-434.
- [19] Kerr, D.S., Huggett, A.M. and Abraham, W.C., Modulation of hippocampal long-term potentiation and depression by corticosteroid receptor activation, *Psychobiol.*, 22 (1994) 123-133.
- [20] Liao, D., Hessler, N.A. and Malinow, R., Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice, *Nature*, 375 (1995) 400-404.
- [21] Luine, V., Villegas, M., Martinez, C. and McEwen, B.S., Repeated stress causes reversible impairments of spatial memory performance, *Brain Res.*, 639 (1994) 167-170.
- [22] Malinow, R. and Tsien, R.W., Presynaptic enhancement shown by whole-cell recording of long-term potentiation in hippocampal slices, *Nature*, 346 (1990) 177-180.

- [23] Manabe, T., Renner, P. and Nicoll, R.C., Postsynaptic contribution of long-term potentiation revealed by the analysis of miniature synaptic currents, *Nature*, 355 (1992) 50-55.
- [24] Maren, S., Tocco, G., Standley, S., Baudry, M. and Thompson, R.F., Postsynaptic factors in the expression of long-term potentiation (LTP): increased glutamate receptor binding following LTP induction in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 (1993) 9654-9658.
- [25] Massicotte, G., Vanderklish, P., Lynch, G. and Baudry, M., Modulation of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid/Quisqualate receptors by phospholipase A2: A necessary step in long-term potentiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88 (1991) 1893-1897.
- [26] McNaughton, B.L., Evidence for two physiologically distinct perforant pathways to the fascia dentata, *Brain Res.*, 199 (1980) 1-19.
- [27] McNaughton, B.L., Long-term synaptic enhancement and short-term potentiation in rat fascia dentata act through different mechanisms, *J. Physiol. (Lond.)*, 324 (1982) 249-262.
- [28] Morris, R.G.M., Garrud, P., Rawlins, J.N.P. and O'Keefe, J.A., Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions, *Nature*, 297 (1992) 681-683.
- [29] Moser, E., Moser, M.-B. and Andersen, P., Synaptic potentiation in the rat dentate gyrus during exploratory learning, *Neuroreport*, 5 (1993) 317-320.

- [30] Moser, M.-B., Trommald, M. and Andersen, P., An increase in dentritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial-learning in adult-rats suggests the formation of new synapses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91 (1994) 12673-12675.
- [31] Olton, D.S. and Pappas, B.C., Spatial memory and hippocampal system function, *Neuropsychologia*, 17 (1979) 669-681.
- [32] Pavlides, C., Watanabe, Y. and McEwen, B.S., Effects of glucocorticoids on hippocampal long-term potentiation, *Hippocampus*, 3 (1993) 183-192.
- [33] Robinson, G.B. and Racine, R.J. Interactions between septal and entorhinal inputs to the rat dentate gyrus: Facilitation effects, *Brain Res.*, 249 (1982) 162-166.
- [34] Shahi, K. and Baudry, M., Increasing binding affinity of agonists to glutamate receptors increases synaptic responses at glutamatergic synapses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 (1992) 6881-6885.
- [35] Sharp, P.E., McNaughton, B.L. and Barnes, C.A., Enhancement of hippocampal field potentials in rats exposed to a novel, complex environment, *Brain Res.*, 339 (1985) 361-365.
- [36] Shors, T.J. and Dryver, E., Stress impedes exploration and the acquisition of spatial information in the 8-arm radial maze, *Psychobiol.*, 20 (1992) 247-253.
- [37] Shors, T.J., Seib, T.B., Levine, S. and Thompson, R.F., Inescapable versus escapable shock modulates long-term potentiation (LTP) in rat hippocampus, *Science*, 244 (1989) 224-226.

- [38] Shors, T.J., Levine, S. and Thompson, R.F. Effects of adrenalectomy and demedulation on the stress-induced impairment of long-term potentiation (LTP), *Neuroendocrinology*, 51 (1990) 70-75.
- [39] Shors, T.J. and Thompson, R.F. Acute stress impairs (or induces) synaptic long-term potentiation (LTP) but does not affect paired-pulse facilitation in the stratum radiatum of rat hippocampus, *Synapse*, 11 (1992) 262-265.
- [40] Tocco, G., Maren, S., Shors, T., Baudry, M. and Thompson, R.F., Long-term potentiation is associated with increased 3H-AMPA binding in rat hippocampus, *Brain Res.*, 573 (1992) 228-234.
- [41] Tocco, G., Shors, T.J., Baudry, M. and Thompson, R.F., Selective increase of AMPA binding to the AMPA/quisqualate receptor in the hippocampus in response to acute stress, *Brain Res.*, 559 (1991) 168-171.
- [42] Tocco, G., Annala, A.J., Baudry, M. and Thompson, R.F., Learning of a hippocampal dependent conditioning task changes the binding properties of AMPA receptors in rabbit hippocampus, *Behav. Neural Biol.*, 58 (1992) 222-231.
- [43] Zalutsky, R.A., and Nicoll, R.A., Comparison of two forms of long-term potentiation in single hippocampal neurons, *Science*, 248 (1990) 1619-1624.

Figure Legends

Figure 1: Illustration of electrode configuration and extracellular field potentials elicited by activation of medial perforant path. **A:** schematic diagram of the hippocampal slice preparation with placement of stimulating and extracellular recording electrodes in the medial third of the dentate gyrus outer molecular layer. **B:** example of extracellular field potential records. The response on the second of two stimuli (50 ms interval) to the medial perforant path does not exhibit facilitation. Each record is the average of 10 traces. Calibration bar = 500 μ V, 5 ms.

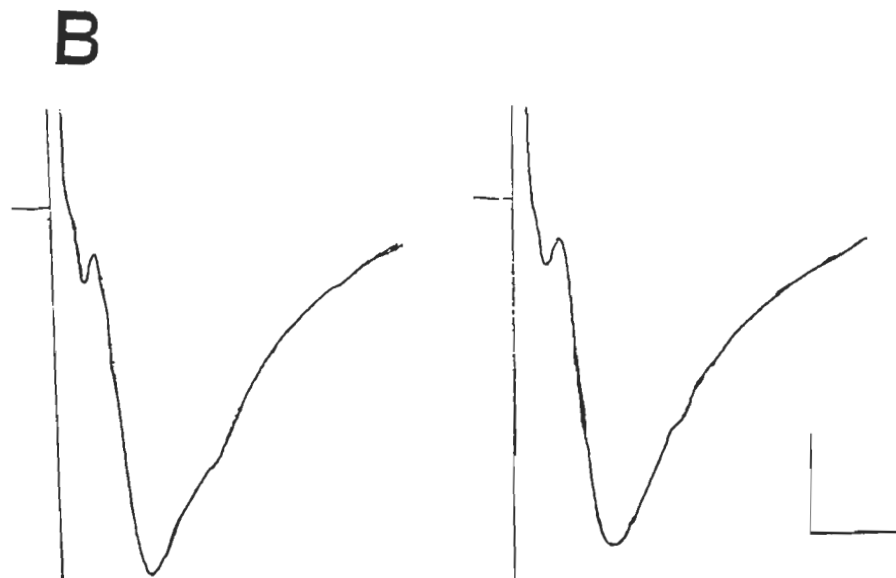
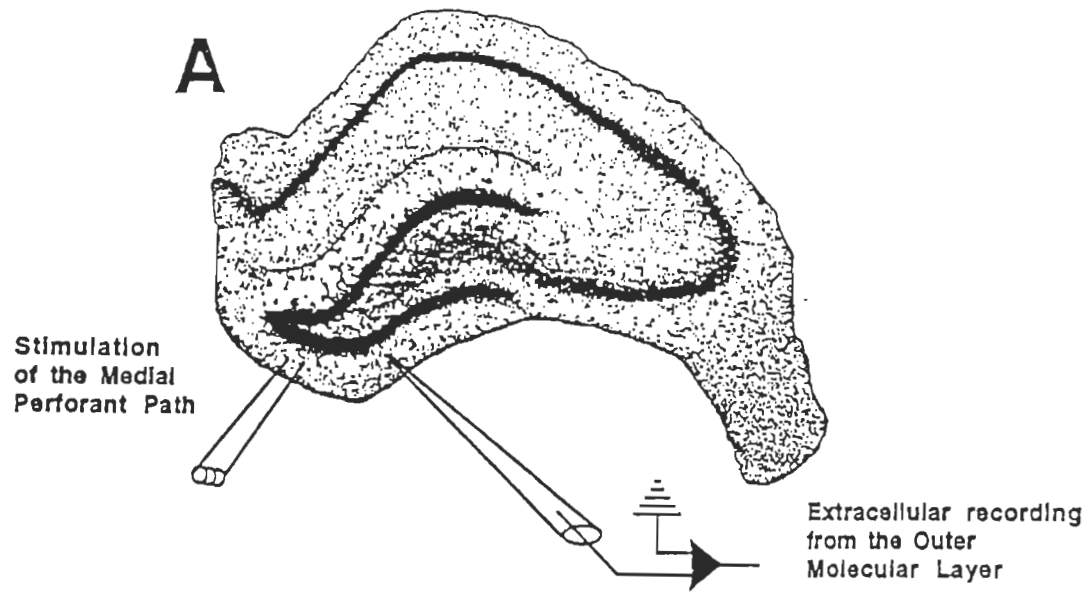
Figure 2: Experience-related increases in synaptic strength are not associated with a change in the paired-pulse ratio. **A:** mean stimulus intensity versus mean EPSP slope for animals experiencing at least 25 days of enriched conditions (EC; filled circles, n=12) and littermates maintained in individual cages (IC; open circles, n=12). **B:** the paired-pulse ratio for each level of the IO curve calculated from the slopes of the EPSP pairs elicited by twin pulses separated by 50 ms. Despite the increase in synaptic strength, the paired-pulse ratio was similar between EC and IC groups across all stimulus levels. Vertical error bars represent the S.E.M. for slope in A and paired-pulse ratio in B. Horizontal error bars in A represent the S.E.M. for stimulus intensity. The same intensities were used for paired-pulse response; however, horizontal error bars were omitted from B for clarity.

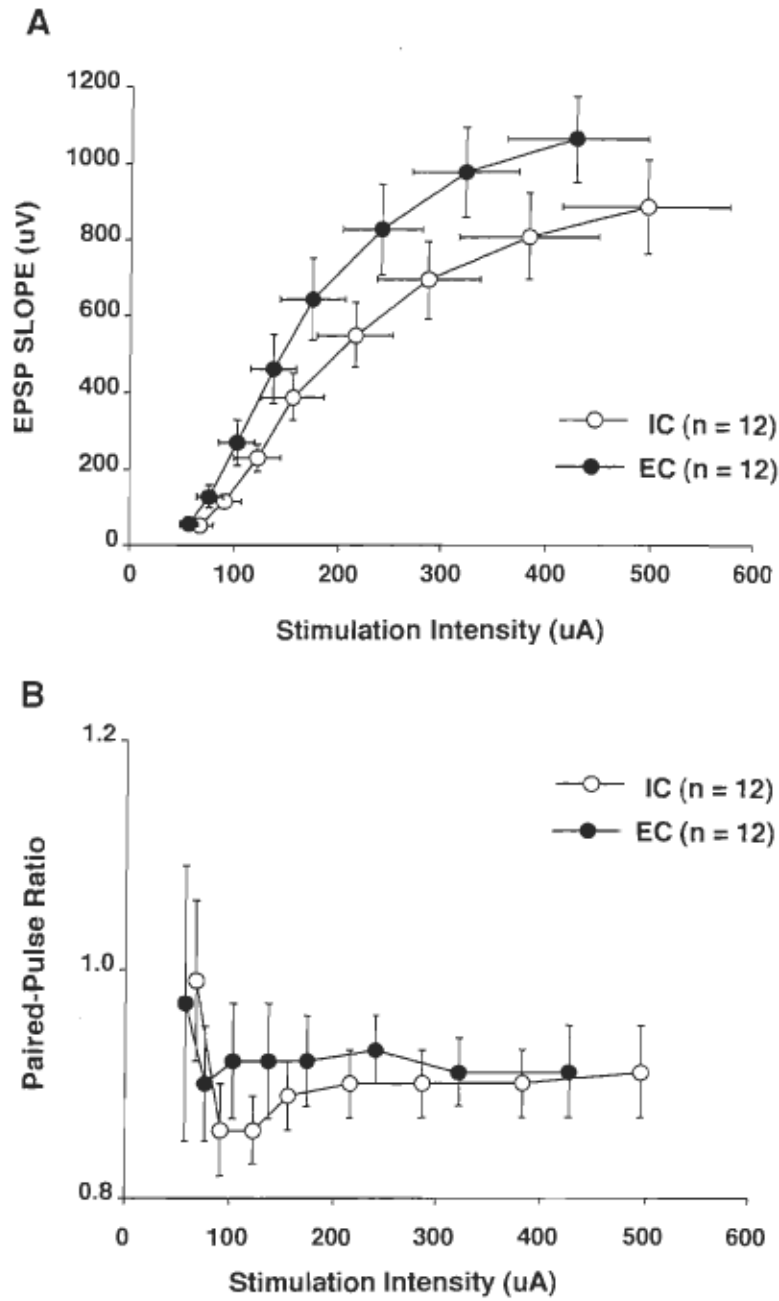
Figure 3: Mean ($\pm$ S.E.M.) EPSP slope normalized to baseline. High frequency stimulation was delivered at time 0.

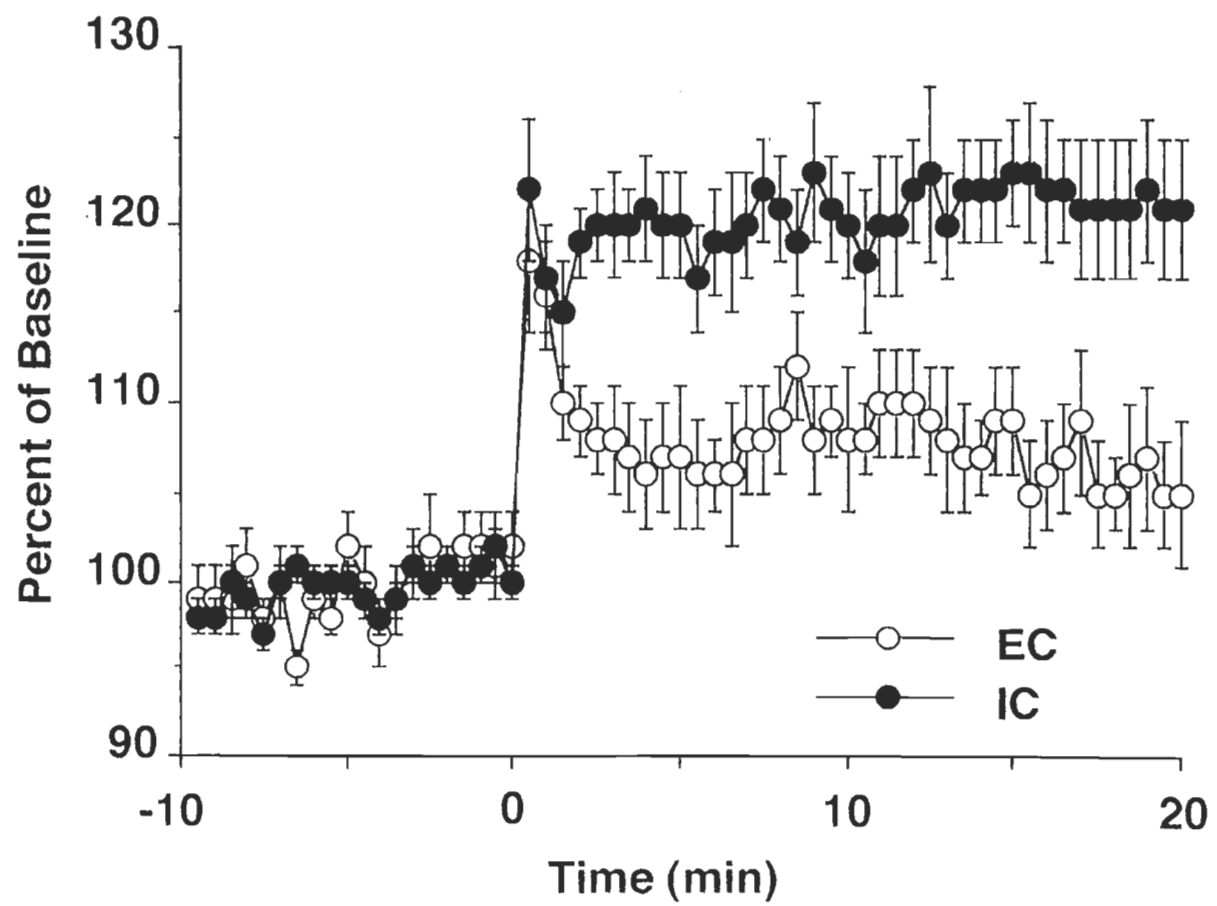
Figure 4: Photomicrographs of autoradiograms showing the distribution of [^3H]AMPA binding for brain sections from rats exposed to environmental enrichment (**right**) or individually-housed control rats (**left**).

Figure 5: Effect of enrichment on glutamate receptor binding in different areas of the brain. Autoradiograms were analyzed using an image analysis system converting gray values into pmol/mg of protein. Data are means of at least four different measurements per rat. Open and filled bars represent mean ($\pm$ S.E.M.). [^3H]AMPA binding (**A**), [^3H]CNQX binding (**B**), and [^3H]glutamate binding (**C**) for IC animals and EC animals, respectively. Asterisk indicates significant increase in AMPA binding ($P < 0.005$).

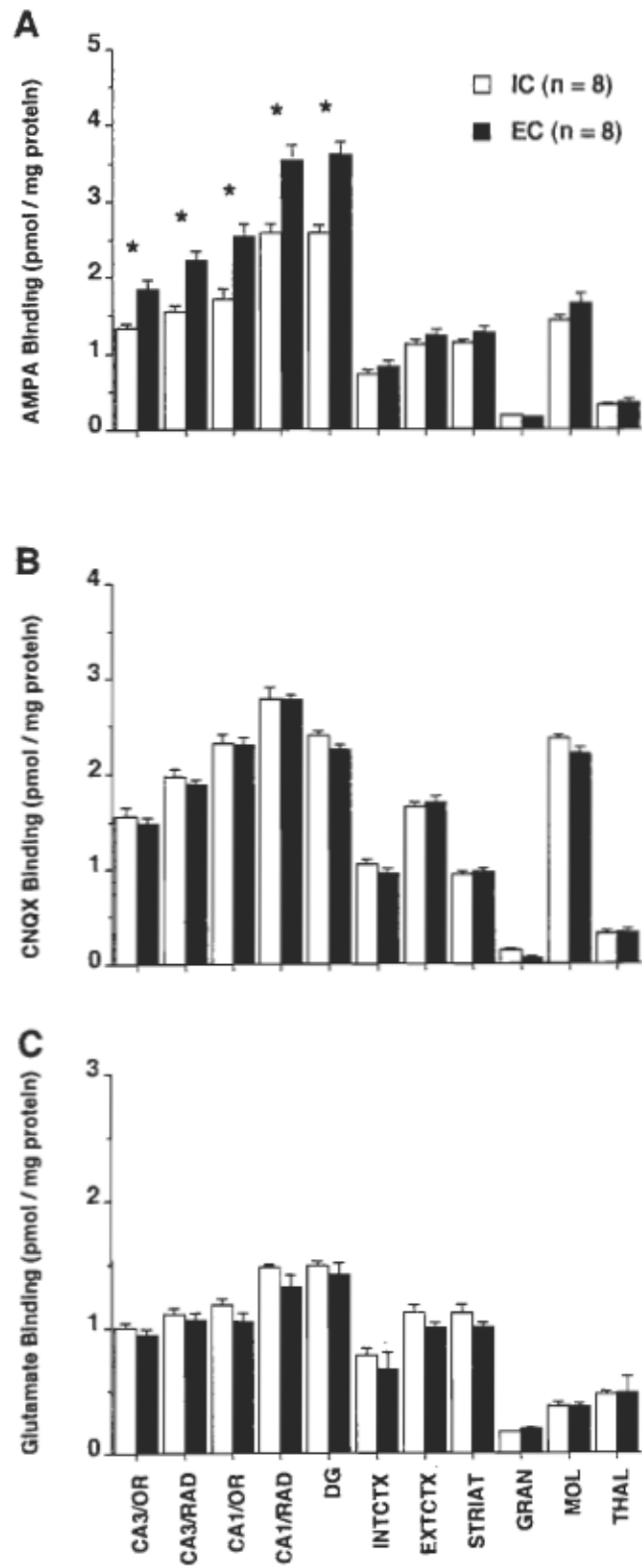
Figure 6: Percent change in glutamate receptor binding in different areas of the hippocampus. Bars represent the mean percent change ($\pm$ S.E.M.) in [^3H]AMPA binding (**open**), [^3H]CNQX binding (**filled**), and [^3H]glutamate binding (**hatched**) relative to the mean receptor binding for IC animals.

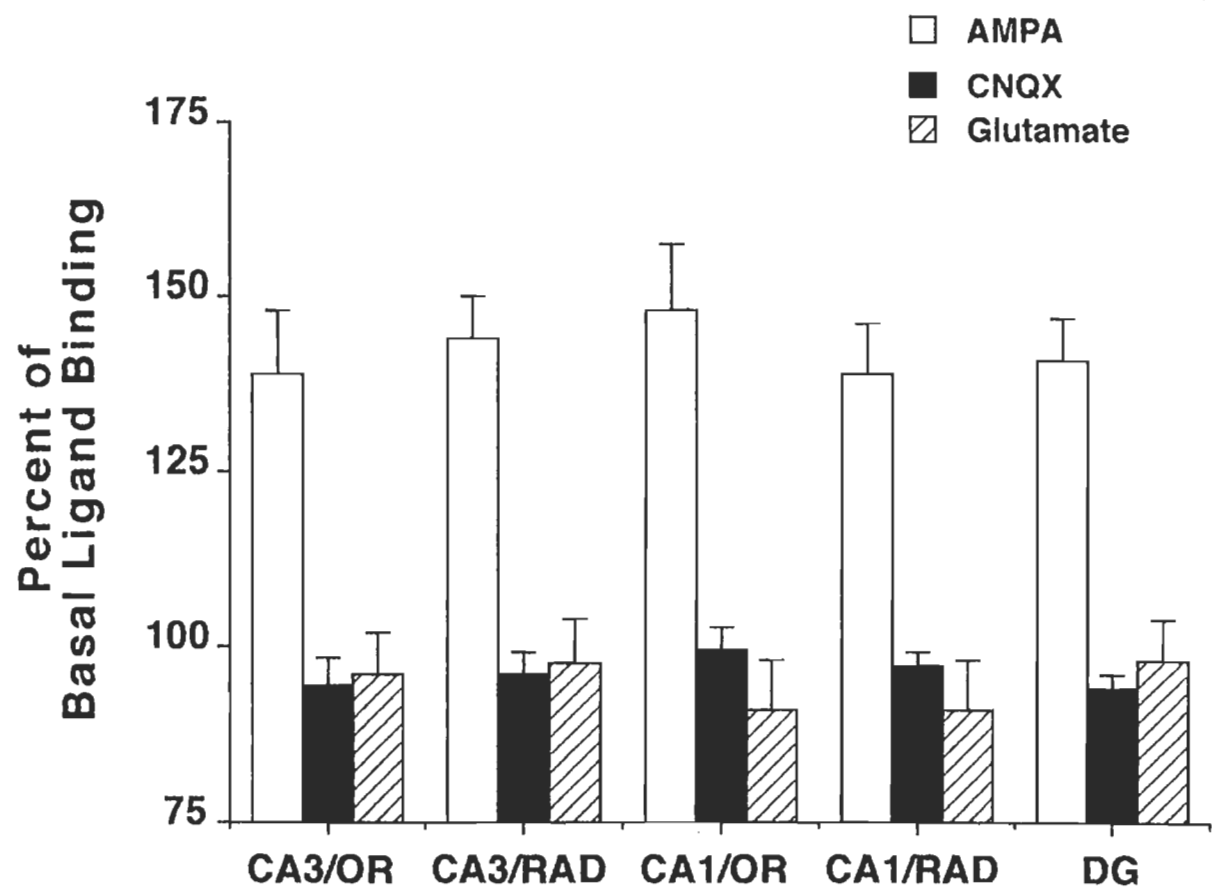












CHAPITRE 2

Deuxième partie

**AMPA receptor properties in adult rat hippocampus
following environmental enrichment**

**Article publié dans
Brain Research 799 (1998) 16-25**

**AMPA RECEPTOR PROPERTIES IN ADULT RAT HIPPOCAMPUS
FOLLOWING ENVIRONMENTAL ENRICHMENT**

Joël Gagné¹, **Sylvie Gélinas**¹, **Maria-Grazia Martinoli**¹, **Thomas C. Foster**⁴,
Maurice Ohayon³, **Richard F. Thompson**², **Michel Baudry**²
and **Guy Massicotte**^{1,3}

¹ Département de Chimie-Biologie
Université du Québec à Trois-Rivières
C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, Canada G9A 5H7

² Program in Neurosciences , University of Southern California
Los Angeles, CA 90089-2520, USA

³ Centre de Recherche de Philippe Pinel
10905 Est, Boulevard Henri-Bourassa
Montréal, Québec, Canada H1C 1H1

⁴ Department of Psychology, University of Virginia
Charlottesville, VA 22903, USA

Send proofs and correspondence to: Guy Massicotte
Département de Chimie-Biologie
UQTR
C.P. 500
Trois-Rivières, Québec, Canada G9A 5H7
Phone (819) 376-5053
Fax (819) 376-5084

ABSTRACT

In adult rats, environmental enrichment has been shown to selectively increase ^3H -AMPA binding in the hippocampus but the molecular mechanisms underlying this effect remain unknown. We used *in situ* hybridization with antisense oligonucleotides to determine possible changes in the hippocampal expression of messenger RNAs for different subunits of AMPA receptors in adult rats following exposure to an enriched environment. Quantitative analysis revealed that mRNA levels for 3 subtypes of AMPA glutamate receptors (GluR1-3; Flip and Flop variants) were not modified in any hippocampal region after environmental enrichment. In addition, no differences were detected in the levels of GluR1 and GluR2/3 proteins in Western blots of hippocampal membranes from enriched rats. Nevertheless, quantitative ligand binding autoradiography indicated that environmental enrichment evoked a significant and uniform decrease in the capacity of calcium or phosphatidylserine (PS) to up-regulate ^3H -AMPA binding in various hippocampal regions but not in the cerebral cortex. These findings support previous observations suggesting that post-translational changes in AMPA receptor properties, as a result of the activation of calcium-dependent processes, may represent an important mechanism underlying long-term modifications of synaptic efficacy in the rat hippocampus.

CLASSIFICATION TERMS

Theme: Theme C: Excitable membrane and synaptic transmission.

Topic: Postsynaptic mechanism.

Keywords: Glutamate receptors, modulation, expression, environmental enrichment.

INTRODUCTION

Several studies have revealed that rats reared in an enriched environment exhibit various behavioral, electrophysiological and biochemical modifications. For instance, adult rats kept under enriched conditions showed enhanced expression of neurotrophin-3 and glucocorticoid mRNAs in the hippocampus [25,34]. In addition, spatial learning, which is dependent on the integrity of hippocampal formation, was improved in rats previously exposed to an enriched environment [23]. At the electrophysiological level, synaptic strength in the medial perforant pathway was increased in animals exposed to enriched conditions [12,15]. Furthermore, the expression of enhanced synaptic function was found to present electrophysiological and biochemical properties similar to those observed after long-term potentiation (LTP) [12], a physiological model of memory storage. The similarities with LTP included augmented synaptic responses mediated by AMPA (DL- α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazolepropionate) receptors and a selective elevation of binding of the glutamate agonist ^3H -AMPA in the hippocampus [12]. Moreover, since LTP in the medial perforant pathway of the dentate gyrus is reduced in enriched rats it has been proposed that both LTP and enrichment act on the same biochemical variables responsible for altering AMPA receptor properties [12,36].

The biochemical mechanisms underlying possible modifications of AMPA receptors during synaptic plasticity remain to be determined but may be due to an increase in the number or affinity of binding sites, or a change in kinetics of the AMPA receptor/channel complex. Molecular cloning techniques have demonstrated that AMPA receptors are constituted of several subunits identified as GluR1-4, and important functional properties of the receptor complex depend on its subunit composition [24,28]. Each subunit exists in 2 different variants, termed Flip and Flop, resulting from alternate splicing. Interestingly, *in situ* hybridization studies have revealed that the 2 splice products exhibit a different regional

pattern of expression during development [27,30]. In addition, quantitative autoradiographic experiments have shown that changes in the expression of mRNAs for certain subunits of AMPA receptors in developing brain are well correlated with modifications of high affinity AMPA binding sites [30]. In adult rats, ligand binding techniques and Western blotting with antibodies against different subunits of AMPA receptors have also established that selective reduction of GluR1 immunoreactivity is associated with parallel changes in ^3H -AMPA binding in the telencephalon of aged mice [1] and in the hippocampus of diabetic rats [14]. Thus, these findings raised the possibility that modifications in ^3H -AMPA binding resulting from environmental enrichment may be related to alterations in the subunit composition of AMPA receptors.

However, an alternative explanation for the changes in ^3H -AMPA binding in enriched conditions could be that receptor properties are modified due to post-translational alterations of existing receptors evoked by the activation of endogenous enzymes [3,21]. In particular, receptor binding experiments have demonstrated that calcium treatment of rat brain sections increases ^3H -AMPA binding in the hippocampal formation [32]. Moreover, incubation of synaptic membranes with calcium-dependent phospholipases (PLA_2) was found to enhance AMPA receptor binding without altering the binding of ligands to NMDA receptors [22], and similar effects were observed following environmental enrichment and induction of LTP [5,12,31]. The exact mechanisms by which lipases alter AMPA receptors remain unknown, but various studies have suggested that the effect of phospholipases is likely due to modifications of the lipid environment of the receptors, as incorporation of phosphatidylserine (PS) into rat brain membranes [4] and brain sections [13] reproduced the increased affinity of AMPA receptors elicited by calcium-dependent PLA_2 .

The present study investigated the molecular mechanism by which environmental enrichment could modify AMPA receptor properties in the rat hippocampus. We first

measured, by *in situ* hybridization and Western blot analysis, the effects of environmental enrichment on the levels of mRNA and on the protein concentrations of different GluR subunits (GluR1, GluR2, GluR3) in various hippocampal regions. Then, we conducted autoradiographic experiments on brain sections to determine changes in calcium- and PS-induced enhancement of ^3H -AMPA binding in enriched rats.

MATERIALS AND METHODS

Environmental enrichment and tissue preparation: At 36-45 days of age, male Sprague-Dawley rats from the same litter were randomly assigned to either environmentally-complex housing (enriched animals; n=10) or regular cages (control; n=10). The control rats were individually housed in wire cages (25 X 18 X 21 cm) and only handled for routine upkeep. The enriched rats were group housed (3 per cage) and several 3-dimensional objects were placed in the cage (25 X 18 X 66 cm), along with rat chow and a water bottle. Everyday, the enriched animals were allowed 1-6 h to explore one of several novel environments, usually a large box, recording cage, or empty maze pool. After 4-5 weeks, both groups were sacrificed and their brains quickly removed and frozen in isopentane (methyl butane) at -20°C, then kept at -70°C until sectioning. Horizontal 10- μ m sections were cut in a cryostat and thaw-mounted on chrome-alum gelatin-coated slides; they were stored at -70°C for no longer than 1 week.

Preparation of oligonucleotide probes and in situ hybridization: Due to the very small differences in whole transcripts of Flip and Flop variants of each GluR, short DNA oligonucleotide probes maximizing mismatch and length were used instead of cRNA probes. Oligonucleotide probes with the same sequences as those reported previously [29] for GluR1-3 (Flip and Flop variants) were obtained commercially and 3' end-labeled with ³⁵S-dATP (22:1 labeled nucleotide to oligonucleotide, 1422 Ci/mmol NEN-Dupont, Wilmington, DE) using terminal deoxynucleotide transferase (Promega, Madison, WI). Incorporation for each oligonucleotide was measured and the labeled probes were purified subsequently with Nuc-Trap columns (Stratagene, La Jolla, CA). Serial sections were fixed for 30 min in 4% buffered paraformaldehyde at room temperature, washed 3 times for 10 min in fresh PBS, and then dehydrated through a bath of increasing alcohol concentration. For each probe, 1 pg/ μ l was diluted in hybridization solution containing 50% formamide, 4X SSC, 5X

Denhardt's solution, 1% SDS, 10% Dextran sulfate, 250 µg/ml tRNA, 25 µg/ml Poly A and C, and 0.1 M dithiothreitol. Sections were hybridized overnight at 42°C, washed in 2X SSC with 0.02 M mercaptoethanol for 3 h at room temperature, and in 0.2X SSC at 60°C for 30 min before dehydration. Slides were exposed to Amersham Beta-Max Hyperfilm for approximately 1 week. Relative optical density (ROD) measurements were obtained using an image analysis system (Imaging Research, MCID, St-Catharines, Ontario).

Electrophoresis and immunoblotting: Western blot analysis was performed on hippocampal membranes from control and enriched rats. Membranes were kept frozen in 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 320 mM sucrose, 1 mM EDTA, 5 mM EGTA, 100 µM leupeptin, and 100 µM PMSF. Aliquots of the membrane preparations were subjected to SDS-PAGE (10% polyacrylamide) according to the method of Laemmli [18]. Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes as described by Towbin et al. [35]. The membranes were first incubated for 1 h at room temperature in Tris-buffered saline (TBS) containing 1% of blocking serum and then incubated with primary antibodies against GluR1 (0.5 µg/ml) or GluR2/3 (0.5 µg/ml) (Upstate Biotechnology Inc., Lake Placid, NY) in TBS containing 0.5% of blocking reagent and 0.05% Tween-20. Bands corresponding to GluR1 or 2/3 were detected with an alkaline phosphatase-conjugated secondary antibody (Boehringer Mannheim Canada, Laval, Québec). The intensity of the immunoreactive bands was quantified densitometrically with a computer imaging system (Imaging Research, MCID, St-Catharine, Ontario) and normalized to the concentration of protein in each sample.

³H-AMPA binding: Sections were preincubated for 1 h in Tris-acetate buffer (100 mM, pH 7.4) containing 100 µM EGTA. Calcium (3 mM) or PS (400 nM) was added for both enriched and control sections as described previously [13]. For ³H-AMPA binding, sections were incubated for 45 min at 0-4°C in Tris-acetate buffer (50 mM, pH 7.4; 100 µM EGTA) containing 50 mM potassium thiocyanate and in the presence of 75 nM of [³H]-AMPA

(specific activity 53 Ci mmol⁻¹, NEN-Dupont, Wilmington, DE). Nonspecific binding was defined as binding measured in the presence of 1 mM quisqualate. The sections were then rinsed in cold incubation buffer twice for 10 sec and once for 5 sec in 50% of the same buffer followed by 3 dips in distilled water. They were then dried rapidly under warm air and used for autoradiography.

Autoradiography: Dried sections as well as tritium standards (ARC, St. Louis, MO) were exposed to tritium-sensitive film (Amersham Hyperfilm, Oakville, Ontario) for 7 days. The films were developed in Sigma developer and fixer. The optical densities of different brain regions were converted to radioactive units using the tritium standards after measurement with an image analysis system (Imaging Research, MCID, St-Catharines, Ontario). ANOVA was followed by Scheffe's post-hoc analysis with the conventional criterion of statistical significance: P values < 0.05.

RESULTS

I) In situ hybridization and immunoblotting analysis

In situ hybridization histochemistry with ³⁵S-labeled DNA oligonucleotide probes and quantitative autoradiography were used to measure mRNAs coding for the Flip and Flop variants of GluR1-3 subunits in brain sections prepared from control and enriched rats. As reported previously, we found that all subunits were clearly predominant in the cell body layers of various hippocampal regions [29]. In addition, results on the hippocampal distribution of GluR2 Flip and Flop variants were in accordance with other studies, showing high levels of GluR2 Flip mRNA expression in all hippocampal regions (CA₁, CA₃ and dentate gyrus), while high level expression for GluR-2 Flop mRNA appeared to be restricted to the dentate gyrus and CA₁ region (Fig. 1; see also Sommer et al. [29]). However, in situ hybridization analysis revealed that, in comparison with control animals, mRNA expression for the 3 subtypes of AMPA glutamate receptors (GluR1-3; Flip and Flop variants) was unchanged in different hippocampal regions in tissue sections prepared from enriched animals (Fig. 2).

The levels of GluR1 and GluR2/3 subunits were also determined by Western blot analysis. In agreement with previous studies, immunological analysis of synaptic membranes indicated that anti-GluR1 and anti-GluR2/3 antibodies recognized bands with a molecular weight of around 106 kDa, which corresponded to the molecular mass of GluR1 and GluR2/3 subunits (Fig. 3). We observed that the amount of immunoreactivity for GluR1 (ROD, 0.68 ± 0.04 in enriched vs. 0.60 ± 0.05 in control rats) and GluR2/3 (ROD, 0.32 ± 0.04 in enriched vs. 0.35 ± 0.05 in control rats) subunits was not modified in membranes prepared from the hippocampus of enriched rats. Altogether, these results strongly suggest that changes in ³H-AMPA binding produced by environmental enrichment were not

associated with modifications in the mRNA level and protein concentrations of different GluR subunits (GluR1, GluR2, GluR3) in the hippocampus.

II Modulation of ^3H -AMPA binding by calcium and PS in enriched rats

To test the possibility that the increase in AMPA receptor binding produced by enriched conditions was mediated by activation of endogenous enzymatic processes, we determined whether behavioral enrichment modified calcium-induced enhancement of ^3H -AMPA binding in tissue sections. Adjacent brain sections were first preincubated at 35°C in the presence or absence of 3 mM calcium acetate and then subjected to ^3H -AMPA ligand binding autoradiography. Figure 4 illustrates typical autoradiograms obtained from both control and enriched rats without (A and B) and with (C and D) calcium preincubation. Visual examination of these autoradiographs clearly indicated that an increase in ^3H -AMPA binding in various areas of the hippocampus was produced by behavioral enrichment. As reported previously [12], enrichment elicited about 40 % enhancement in ^3H -AMPA binding to the strata radiatum and oriens of areas CA₃ and CA₁ of the hippocampus, while no modifications in ^3H -AMPA binding were found in the striatum and cerebral cortex. We also confirmed that calcium treatment increased ^3H -AMPA binding and that the combination of enrichment and calcium treatment evoked higher binding than either treatment alone (see Table I). However, quantitative analysis indicated that enrichment-induced enhancement of ^3H -AMPA binding markedly reduced the calcium effects on AMPA receptors in various hippocampal regions. Statistical analysis revealed that the regions exhibiting a significant decrease in responsiveness to calcium in enriched rats included the strata radiatum and oriens of areas CA₁ and CA₃ as well as the molecular layer of the dentate gyrus. No significant difference in the capacity of calcium to increase ^3H -AMPA binding was found between control and enriched animals in the cortex and striatum (Fig. 4E).

Numerous studies have indicated that the binding properties of the AMPA subtype of glutamate receptors can be modulated by their lipid environment [3,13,21]. To determine whether the reduced capacity of calcium-dependent processes to modulate ^3H -AMPA binding was due to alterations in the lipid environment of enriched animals, we examined ^3H -AMPA binding in control and enriched rats after preincubation of brain sections with the phospholipid PS. Adjacent brain sections were preincubated at 35°C in the presence or absence of 400 nM PS and were then subjected to ^3H -AMPA ligand binding autoradiography. As reported previously, PS treatment increased ^3H -AMPA binding in various hippocampal regions (Table I). Here again, quantitative analysis indicated that enrichment-induced enhancement of ^3H -AMPA binding markedly reduced the capacity of PS to up-regulate ^3H -AMPA binding in all hippocampal regions analyzed. Statistical analysis revealed that the regions showing a significant decrease in response to PS in enriched rats included the strata radiatum and oriens of areas CA_1 and CA_3 as well as the molecular layer of the dentate gyrus (Fig. 5). However, no significant difference in the capacity of PS to increase ^3H -AMPA binding was found in the cerebral cortex.

DISCUSSION

The present results confirm and extend the previously reported observation that ^3H -AMPA binding in the hippocampus is increased by environmental enrichment [12]. *In situ* hybridization analysis and immunoblotting procedures strongly suggest that enhancement of AMPA binding generated by environmental enrichment is probably not a direct consequence of modification in the expression of AMPA receptor subunits (GluR1-3; Flip and Flop variants) in the hippocampus. In addition, quantitative ligand binding autoradiography indicated that environmental enrichment resulted in a significant and uniform decrease in the capacity of calcium and phosphatidylserine to up-regulate ^3H -AMPA binding in various hippocampal regions. Altogether, this study strongly reinforces the hypothesis that experience-mediated hippocampal synaptic plasticity is linked to modulation of AMPA receptor function by calcium-dependent mechanisms [3,21] rather than modification in the expression of AMPA receptor subunits.

The observation that LTP in the medial perforant pathway of the dentate gyrus is reduced in enriched rats has suggested that both LTP and environmental enrichment act on the same biochemical variables [12]. This idea was further strengthened by results showing that environmental enrichment was accompanied by an increase in AMPA receptor binding in the hippocampus with little change in ^3H -glutamate binding to NMDA receptors [12], an effect similar to what was found following LTP-induction in the perforant pathway [5,31]. The molecular mechanism responsible for the increased ^3H -AMPA binding after LTP and environmental enrichment remains unknown. As mentioned previously, molecular cloning techniques have demonstrated that AMPA receptors are constituted of several subunits identified as GluR1-4 [24,28]. In the present study, no differences were detected in the levels of GluR1 and GluR2/3 proteins in Western blots of hippocampal membranes from enriched rats. We cannot yet totally exclude the possibility that changes in the expression of

GluR4 subunits might contribute to the modulation of AMPA receptor properties following enrichment. However, as very low levels of GluR4 subunits are detected in hippocampal pyramidal neurons [26], and GluR4 subunits are mainly expressed in astrocytes [11], it seems unlikely that this subunit might contribute to the relatively high increase of ^3H -AMPA binding in enriched animals.

A number of experimental observations support the hypothesis that activation of the calcium-dependent enzyme PLA_2 may be part of the molecular mechanisms underlying AMPA receptor modifications during synaptic plasticity [5,22]. For instance, NMDA receptor activation produces long-lasting enhancement of endogenous PLA_2 activity [17], and several PLA_2 inhibitors block LTP formation in the hippocampus [3]. In addition, we noted previously that similar to LTP and environmental enrichment, treatment of telencephalic membranes [20] or tissue sections with calcium-dependent phospholipases increased ^3H -AMPA binding to AMPA receptors [33]. The idea that a change in AMPA receptor properties plays an important role in synaptic plasticity was further supported by studies showing that both calcium and PLA_2 -induced enhancement in ^3H -AMPA binding were markedly reduced under experimental conditions associated with LTP impairment in the hippocampus [8,22]. The effect of phospholipases on ^3H -AMPA binding is likely due to modifications of the lipid environment of the receptors, as incorporation of PS into rat brain membranes [4], as well as brain sections [13], reproduced the increased affinity of AMPA receptors evoked by PLA_2 . Thus, it is reasonable to speculate that the reduced capacity of both calcium and PS to change the binding properties of AMPA receptors in the hippocampus of rats subjected to behavioral enrichment may arise from AMPA receptor modulation by endogenous calcium-dependent phospholipases.

It is important to point out that changes in the lipid environment of AMPA receptors may also be caused by activation of other calcium-dependent enzymes such as proteases,

which are suspected to also play an important role in synaptic plasticity [3,21]. The asymmetric distribution of the aminophospholipid PS across the bilayer of biological membranes is well established. In membranes, much of PS is localized in the inner leaflet of the lipid bilayer. This asymmetric distribution of PS is thought to come from: *i*) strong interactions between cytoskeletal proteins (such as spectrin) and PS and *ii*) translocation of PS from outside to inside of the bilayer by an ATP-dependent aminophospholipid translocase [9,10,40]. Alterations in PS asymmetry of membranes have been correlated with changes in various physiological functions. The redistribution of PS to the outer leaflet of the membrane could be due to the disruption of interactions between the aminophospholipid of the plasma membrane and the cytoskeletal proteins and/or inhibition of translocase activity. Interestingly, activation of the calcium-dependent protease calpain inhibits translocase activity [10,40], and treatment of rat brain sections with purified calpain increases ^3H -AMPA binding [32]. These results indicate a possible link between calpain activity and the distribution of membrane phospholipids on the one hand and regulation of AMPA receptor properties on the other hand during environmental enrichment. Nevertheless, because PS has been shown to increase protein kinase C (PKC) activity [6] and, since this kinase was found to modulate AMPA receptor properties [19], it is possible that the reduced capacity of PS to up-regulate AMPA receptor properties could reflect previous activation of PKC in enriched rats. Further experiments are required to determine the relative contributions of these types of biochemical modifications in the regulation of AMPA receptor binding in the hippocampus of enriched animals.

Regardless of the intimate details of mechanisms involved in the effects of enrichment on ^3H -AMPA binding, our results may have interesting implications for understanding the mechanisms underlying long-lasting changes in synaptic operation. Indeed, the present finding that PS-induced modifications in AMPA receptor binding are altered in adult rats

following environmental enrichment raises the possibility that regulation of the lipid environment by calcium-dependent enzymes in membranes could be an important process for controlling synaptic operation. This idea was prompted previously by infrared spectroscopic analysis of brain membranes revealing changes in lipid properties resulting from discriminative learning in rats [37]. In addition, the unique role of phospholipids in controlling synaptic operation was suggested by earlier experiments showing that *in vivo* administration of PS increased LTP expression in the rat hippocampus [7], and the same treatment was reported to improve the acquisition and retention of a variety of learned behaviors in adult [38] and aged rats [39]. The existence of a relationship between synaptic plasticity and the effects of phospholipids on AMPA receptors was further supported by studies revealing a lack of PS-induced increases in ^3H -AMPA binding in the hippocampus at developmental stages [13] characterized by LTP deficits [2,16] and by insensitivity to environmental stimulation [36].

In conjunction with previous investigations showing that changes in the lipid environment altered AMPA receptor properties, our results indicate that phospholipid-induced increases in ^3H -AMPA binding are an important mechanism underlying alterations in hippocampal function during environmental enrichment.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: *In situ* hybridization of GluR2 Flip and Flop mRNAs in the rat hippocampus after environmental enrichment.

In situ hybridization using ^{35}S end-labeled DNA oligonucleotide probes detecting mRNAs for the AMPA glutamate receptor subtype GluR2 Flip (A and B) and GluR2 Flop (C and D) on sections prepared from control (A and C) and enriched rat brains (B and D). Visual examination of autoradiographs revealed no alteration in mRNA levels in enriched sections compared with the controls for both GluR2 Flip and Flop.

Figure 2: Quantitative expression of mRNA levels for different AMPA receptor subunits in the rat hippocampus after environmental enrichment.

Optical densities (OD) obtained from *in situ* hybridization using ^{35}S end-labeled DNA oligonucleotides detecting mRNAs for various AMPA glutamate receptor subtypes (GluR1, GluR2 and GluR3; Flip=i and Flop=o variants) on sections prepared from control (open bars) and enriched (closed bars) rats. Note that environmental enrichment did not modify mRNA expression of any subunit of AMPA receptors when compared with the controls in different hippocampal regions (Figure 2A, 2B and 2C). The data represent the means $\pm$ SEM of at least 6-8 different measurements per rat, with 5 different rats.

Figure 3: Protein levels of GluR1 and GluR2/3 subunits in hippocampal membranes after environmental enrichment.

Hippocampal membranes (15 $\mu\text{g}/\text{lane}$) were subjected to SDS-PAGE and immunoblotted with anti-GluR antibodies. Right arrows indicate molecular weight standards. Each anti-peptide antibody detected a single major immunoreactive band at 106 kDa in both normal and enriched rats.

Figure 4: Effect of environmental enrichment on the calcium-induced increase in ^3H -AMPA binding in rat brain sections.

Adjacent horizontal sections were preincubated at 35°C for 1 h in Tris-acetate buffer (100 mM, pH 7.4, containing 100 μM EGTA) without or with 3 mM calcium (A; control, B; enriched, C; control + calcium, D; enriched + calcium). E) All autoradiographs were analyzed with a digital analysis system for various hippocampal regions, the parieto-temporal cortex and the striatum (see Table I). The results represent calcium-induced stimulation of ^3H -AMPA binding (expressed as percentage increases over basal binding) in control (open bars) and enriched sections (closed bars). The results are means $\pm$ S.E.M. of at least 6-8 different measurements per rat with 5 different rats ($F_{7,56} = 10.09$; $P < 0.001$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ versus controls, Scheffe's test.

Figure 5: Effect of environmental enrichment on the PS-induced increase in ^3H -AMPA binding in rat brain sections.

Adjacent horizontal sections were preincubated at 35°C for 1 h in Tris-acetate buffer (100 mM, pH 7.4, containing 100 μM EGTA) without or with 400 nM PS. All autoradiographs were analyzed with a digital analysis system for various hippocampal regions, the parieto-temporal cortex and the striatum (see Table I). The results represent PS-induced stimulation of ^3H -AMPA binding (expressed as percentage increases over basal binding) in control (open bars) and enriched sections (closed bars). The results are means $\pm$ S.E.M. of at least 7-8 different measurements per rat with 5 different rats ($F_{7,56} = 26.6$; $P < 0.0001$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ versus controls, Scheffe's test.

REFERENCES

1. B. A. Bahr, A. C. Godshall, R. A. Hall, G. Lynch, Mouse telencephalon exhibits an age-related decrease in glutamate (AMPA) receptors but no change in nerve terminal markers. *Brain Res.* 589 (1992) 320-326.
2. M. Baudry, D. Arst, M. Oliver, G. Lynch, Development of glutamate binding sites and their regulation by calcium in rat hippocampus, *Brain Res.* 227 (1981) 37-48.
3. M. Baudry, G. Massicotte, Physiological and pharmacological relationships between long-term potentiation and mammalian memory, *Conc. Neurosci.* 3 (1992) 79-98.
4. M. Baudry, G. Massicotte, S. Hauge, Phosphatidylserine increases the affinity of the AMPA/Quisqualate receptor in rat brain membranes, *Behav. Neural Biol.* 55 (1991) 137-140.
5. J. Bernard, A. Lahsaini, G. Massicotte, Potassium-induced long-term potentiation in area CA1 of the hippocampus involves phospholipase activation, *Hippocampus* 4 (1994) 447-453.
6. L. T. Boni, R. R. Rando, The nature of protein kinase C activation by physically defined phospholipid vesicles and diacylglycerols, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 10819-10825.
7. C. A. Borghese, R. A. Gomez, O. A. Ramirez, Phosphatidylserine increases hippocampal synaptic efficacy, *Brain Res. Bull.* 31 (1993) 697-700.

8. C. Chabot, G. Massicotte, M. Milot, F. Trudeau, J. Gagné, Impaired modulation of AMPA receptors by calcium-dependent processes in streptozotocin-induced diabetic rats, *Brain Res.* 768 (1997) 249-256.
9. P. Comfurius, E. M. Bevers, R. F. Zwaal, Interaction between phosphatidylserine and the isolated cytoskeleton of human blood platelets, *Biochim. Biophys. Acta* 983 (1989) 212-216.
10. P. Comfurius, J. M. G. Senden, R. H. J. Tilly, A. J. Schroit, E. M. Bevers, R. F. A. Zwaal, Loss of membrane phospholipid asymmetry in platelets and red cells may be associated with calcium-induced shedding of plasma membrane and inhibition of aminophospholipid translocase, *Biochim. Biophys. Acta* 1026 (1990) 153-160.
11. D. F. Condorelli, P. Dell'Albani, M. Corsaro, V. Barresi, A. M. Giuffrida Stella, AMPA-selective glutamate receptor subunits in astroglial cultures, *J. Neurosci. Res.* 36 (1993) 344-356.
12. T. C. Foster, J. Gagné, G. Massicotte, Mechanism of altered synaptic strength due to experience: relation to long-term potentiation, *Brain Res.* 736 (1996) 243-250.
13. J. Gagné, C. Giguère, G. Tocco, M. Ohayon, R. F. Thompson, M. Baudry, G. Massicotte, Effect of phosphatidylserine on the binding properties of glutamate receptors in brain sections from adult and neonatal rats, *Brain Res.* 740 (1996) 337-345.

14. J. Gagné, M. Milot, S. Gélinas, A. Lahsaïni, F. Trudeau, M. G. Martinoli, G. Massicotte, Binding properties of glutamate receptors in streptozotocin-induced diabetes in rats, *Diabetes* 46 (1997) 841-846.
15. E. J. Green, W. T. Greenough, Altered synaptic transmission in dentate gyrus of rats reared in complex environments: evidence from hippocampal slices maintained in vitro, *J. Neurophysio.* 55 (1986) 739-750.
16. K. M. Harris, T. J. Teyler, Developmental onset of long-term potentiation in area CA1 of the rat hippocampus, *J. Physiol. (Lond)* 346 (1984) 27-48.
17. D. Y. Kim, G. Rordorf, R. A. Nemenoff, W. J. Koroshetz, J. V. Bonventre, Glutamate stably enhances the activity of two cytosolic forms of phospholipase A2 in brain cortical cultures, *Biochem. J.* 310 (1995) 83-90.
18. U. K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680-685.
19. R. A. Lanius, B. A. Pasqualotto, C. A. Shaw, A novel mechanism of AMPA regulation: ionically triggered kinases and phosphatases, *Neuroreport* 4 (1993) 795-798.
20. G. Massicotte, M. Baudry, Modulation of AMPA/Quisqualate receptors by phospholipase A2 treatment, *Neurosci. Lett.* 118 (1990) 245-248.
21. G. Massicotte, M. Baudry, Triggers and substrates of hippocampal synaptic plasticity, *Neuro. Biobehav. Rev.* 15 (1991) 415-423.

22. G. Massicotte, P. Vanderklish, G. Lynch, M. Baudry, Modulation of AMPA/Quisqualate receptors by Phospholipase A2: A necessary step in long-term potentiation, *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 88 (1991) 1893-1897.
23. M. B. Moser, M. Trommaid, P. Andersen, An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 91 (1994) 12673-12675.
24. S. Nakanishi, Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function, *Science* 258 (1992) 597-603.
25. T. Olson, A. H. Mohammed, L. F. Donaldson, B. G. Henriksson, J. R. Seckl, Glucocorticoid receptor and NGFI-A gene expression are induced in the hippocampus after environmental enrichment in adult rats, *Mol. Brain Res.* 23 (1994) 349-353.
26. W. Y. Ong, S. K. Leong, L. J. Garey, R. Reynolds, A. W. Liang, An immunocytochemical study of glutamate receptors and glutamine synthase in the hippocampus rats injected with kainate, *Exp. Brain Res.* 109 (1996) 251-267.
27. D. E. Pellegrini-Giampietro, M. V. L. Bennett, R. S. Zukin, Differential expression of three glutamate receptor genes in developing rat brain: an in situ hybridization study, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 88 (1991) 4157-4161.
28. P. H. Seeburg, The molecular biology of mammalian glutamate receptors channels, *TINS* 16 (1993) 359-365.

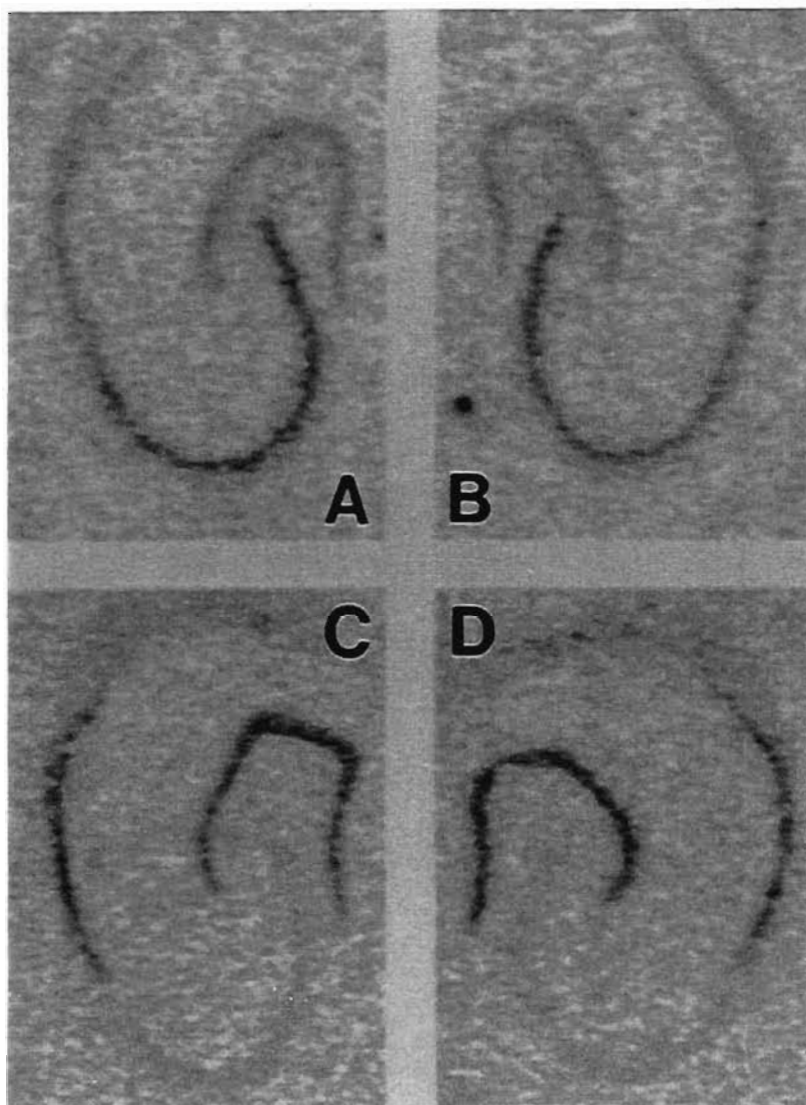
29. B. Sommer, K. Keinänen, T. A. Verdoorn, W. Wisden, N. Burnashev, A. Herb, M. Kohler, T. Takagi, B. Sakmann, P. H. Seeburg, Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS, *Science* 249 (1990) 1580-1585.
30. S. Standley, G. Tocco, M. F. Tourigny, G. Massicotte, R. F. Thompson, M. Baudry, Developmental changes in amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate receptor properties and expression in the rat hippocampal formation, *Neurosci.* 67 (1995) 881-892.
31. G. Tocco, S. Maren, T. Shors, M. Baudry, R. F. Thompson, Long-term potentiation is associated with increased 3H-AMPA binding in rat hippocampus, *Brain Res.* 573 (1992) 228-234.
32. G. Tocco, G. Massicotte, S. Standley, R. F. Thompson, M. Baudry, Effect of temperature and calcium on the binding properties of the AMPA receptor in frozen rat brain sections, *Eur. J. Neurosci.* 4 (1992) 1093-1103.
33. G. Tocco, G. Massicotte, S. Standley, R. F. Thompson, M. Baudry, Phospholipase A2-induced changes in the affinity of the AMPA receptor: an autoradiographic study, *Neuroreport* 3 (1992) 515-518.
34. M. Torasdotter, M. Metsis, B. G. Henriksson, B. Winblad, A. H. Mohammed, Expression of neurotrophin-3 mRNA in the rat visual cortex and hippocampus is influenced by environmental conditions, *Neurosci. Lett.* 218 (1996) 107-110.

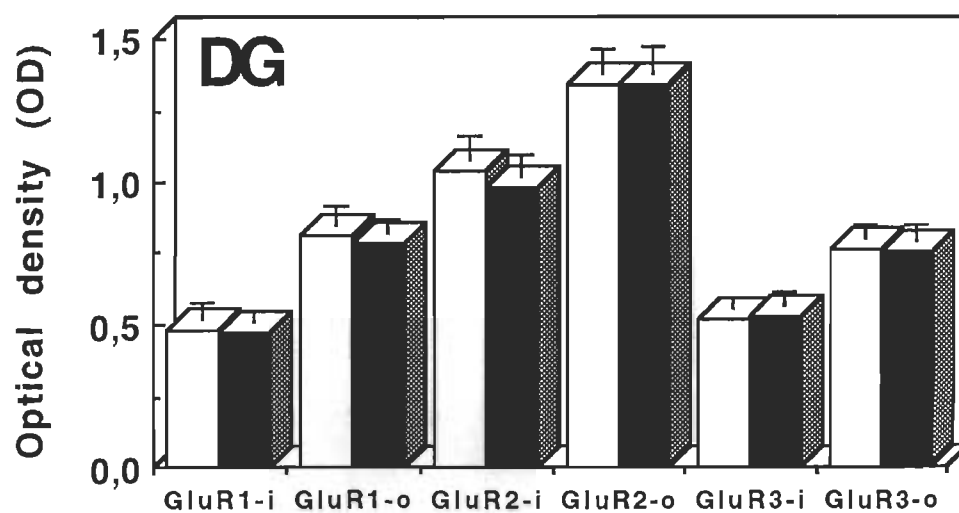
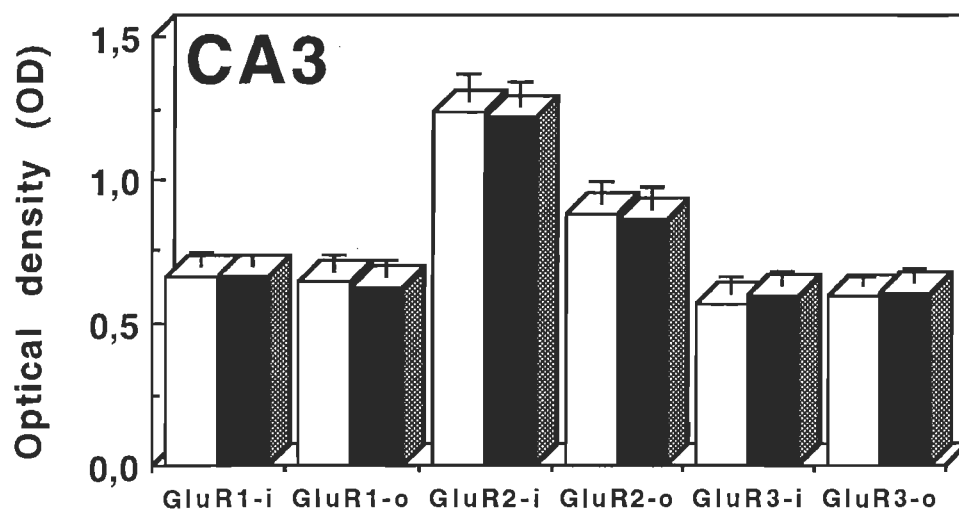
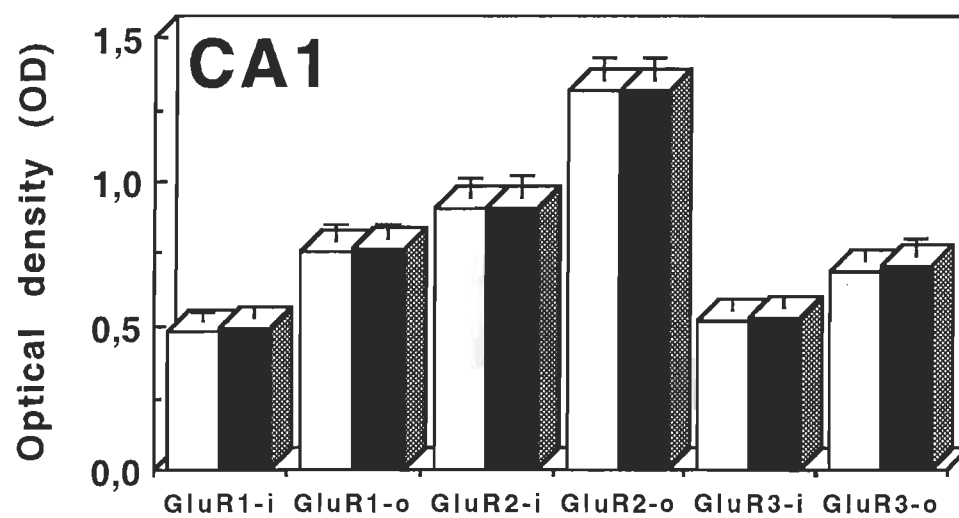
35. H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheet: Procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 76 (1979) 4350-4354.
36. N. S. Waters, A. Y. Klintsova, T. C. Foster, Insensitivity of the hippocampus to environmental stimulation during postnatal development, *J. Neurosci.* 17 (1997) 7967-7973.
37. S. Yoshida, New infrared spectroscopic technique as a tool to reveal roles of unsaturated fatty acids in diseases and synaptic functions, *Obesity Res.* 3 (1995) 761S-767S.
38. A. Zanotti, F. Aporti, G. Toffano, L. Valzelli, Effects of phosphatidylserine on avoidance relearning in rats, *Pharmacol. Res. Comm.* 16 (1984) 485-493.
39. A. Zanotti, L. Valzelli, G. Toffano, Chronic phosphatidylserine treatment improves spatial memory and passive avoidance in aged rats, *Psychopharmacol.* 99 (1989) 316-321.
40. R. F. Zwaal, E. M. Bevers, P. Comfurius, J. Rosing, R. H. J. Tilly, P. F. J. Verhallen, Loss of membrane phospholipid asymmetry during activation of blood platelets and sickled red cells; mechanisms and physiological significance, *Mol. Cell. Biochem.* 91 (1989) 23-31.

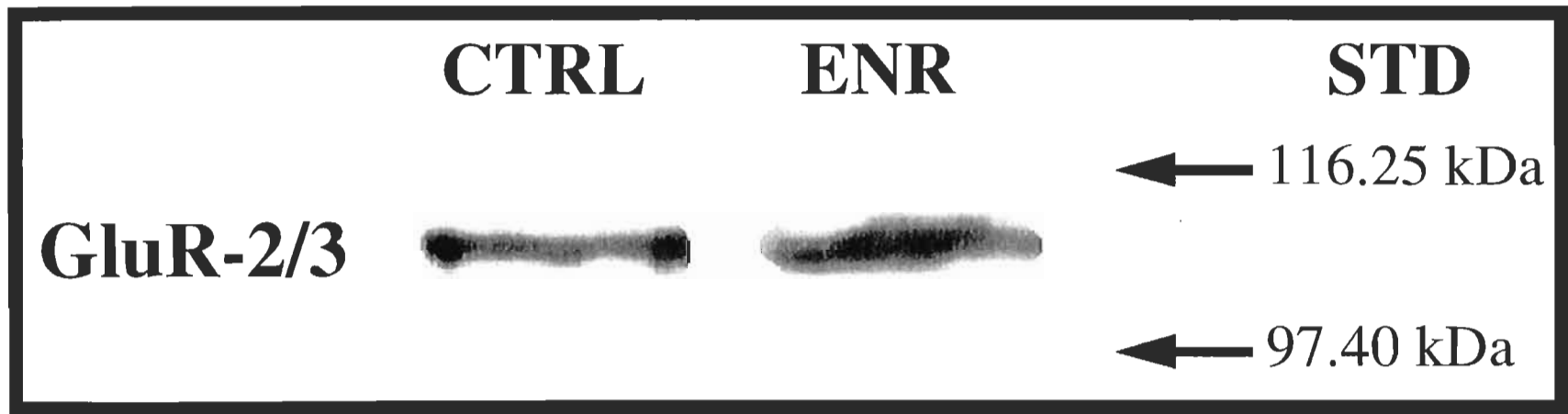
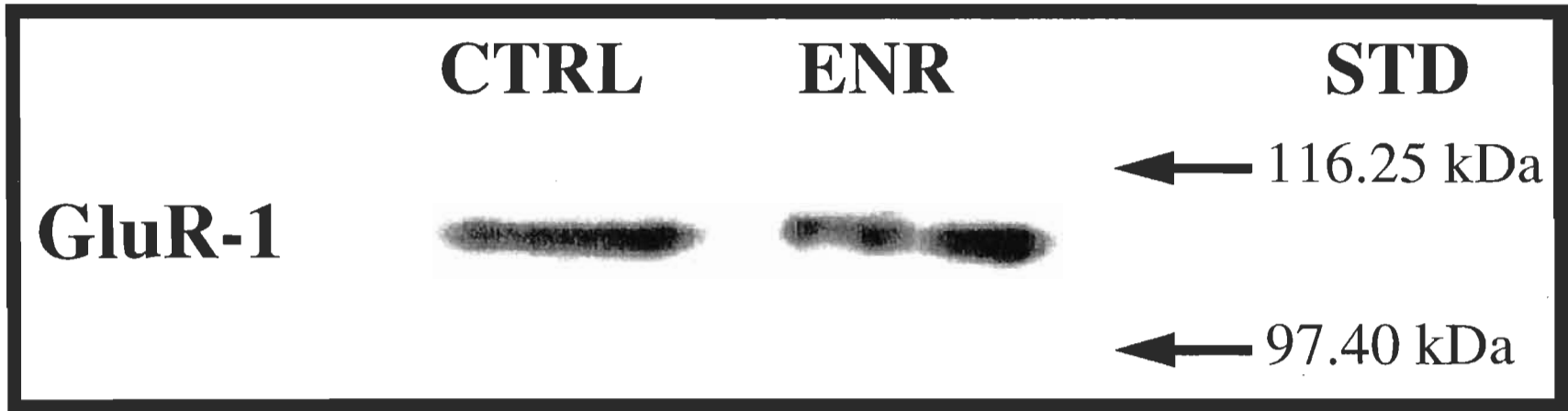
TABLE I: Modulation of ^3H -AMPA binding in different brain structures following environmental enrichment: effects of calcium and phosphatidylserine (PS)

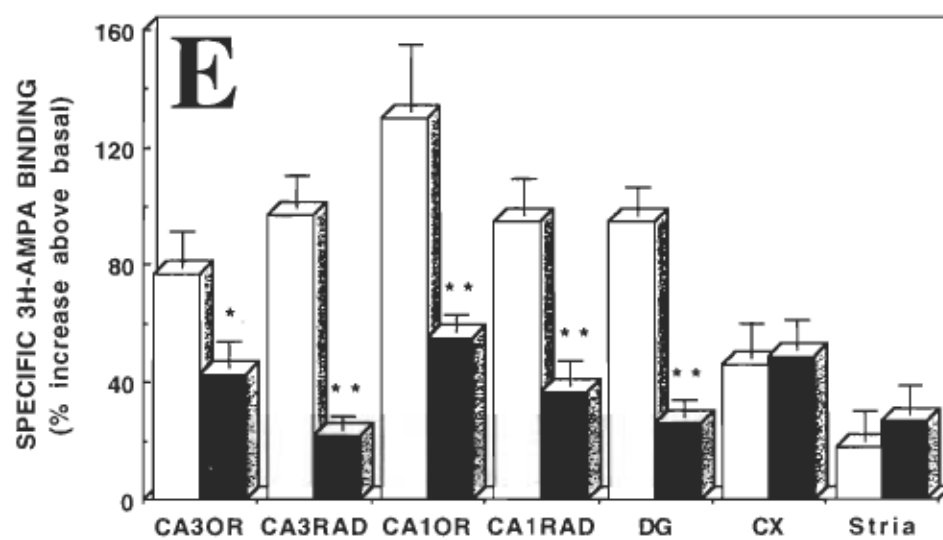
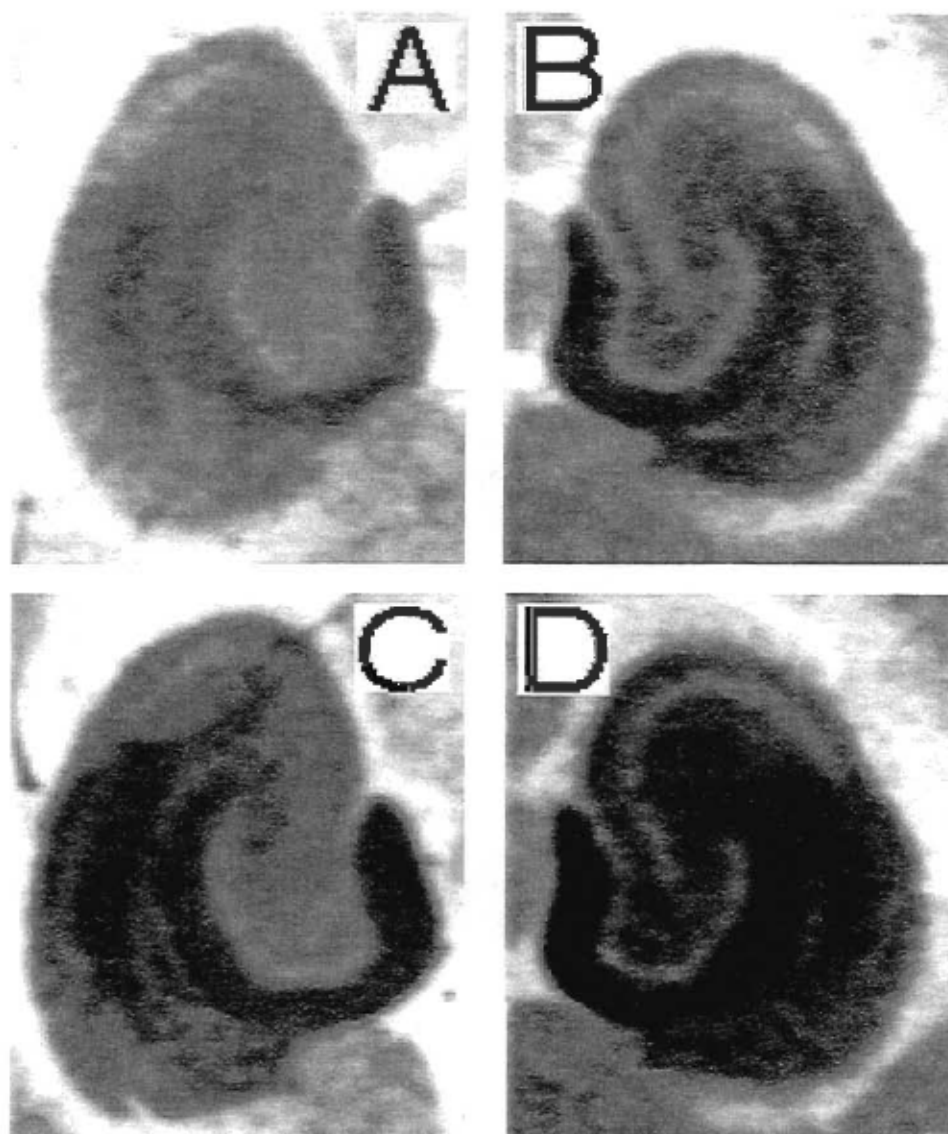
CONDITIONS	SPECIFIC ^3H -AMPA BINDING (pmol/mg protein)						
	CA3OR	CA3RAD	CA1OR	CA1RAD	DG	CX	Stria
Non-treated sections							
Control	0.90 ± 0.06	0.96 ± 0.06	0.94 ± 0.08	1.46 ± 0.11	1.50 ± 0.16	0.80 ± 0.05	0.84 ± 0.06
Enriched	$1.26 \pm 0.07^*$	$1.38 \pm 0.07^*$	$1.46 \pm 0.10^*$	$2.04 \pm 0.12^{**}$	$2.06 \pm 0.12^{**}$	0.88 ± 0.06	0.86 ± 0.05
Calcium-treated sections							
Control	1.60 ± 0.10	1.90 ± 0.14	2.16 ± 0.12	2.84 ± 0.14	2.92 ± 0.13	1.16 ± 0.10	1.00 ± 0.08
Enriched	1.80 ± 0.10	1.68 ± 0.07	2.26 ± 0.10	2.78 ± 0.14	2.60 ± 0.12	1.32 ± 0.08	1.10 ± 0.08
PS-treated sections							
Control	1.51 ± 0.10	1.74 ± 0.12	1.60 ± 0.14	2.33 ± 0.14	1.98 ± 0.10	1.09 ± 0.12	0.87 ± 0.05
Enriched	1.53 ± 0.10	1.80 ± 0.10	1.71 ± 0.12	2.46 ± 0.12	2.25 ± 0.10	1.22 ± 0.04	0.94 ± 0.05

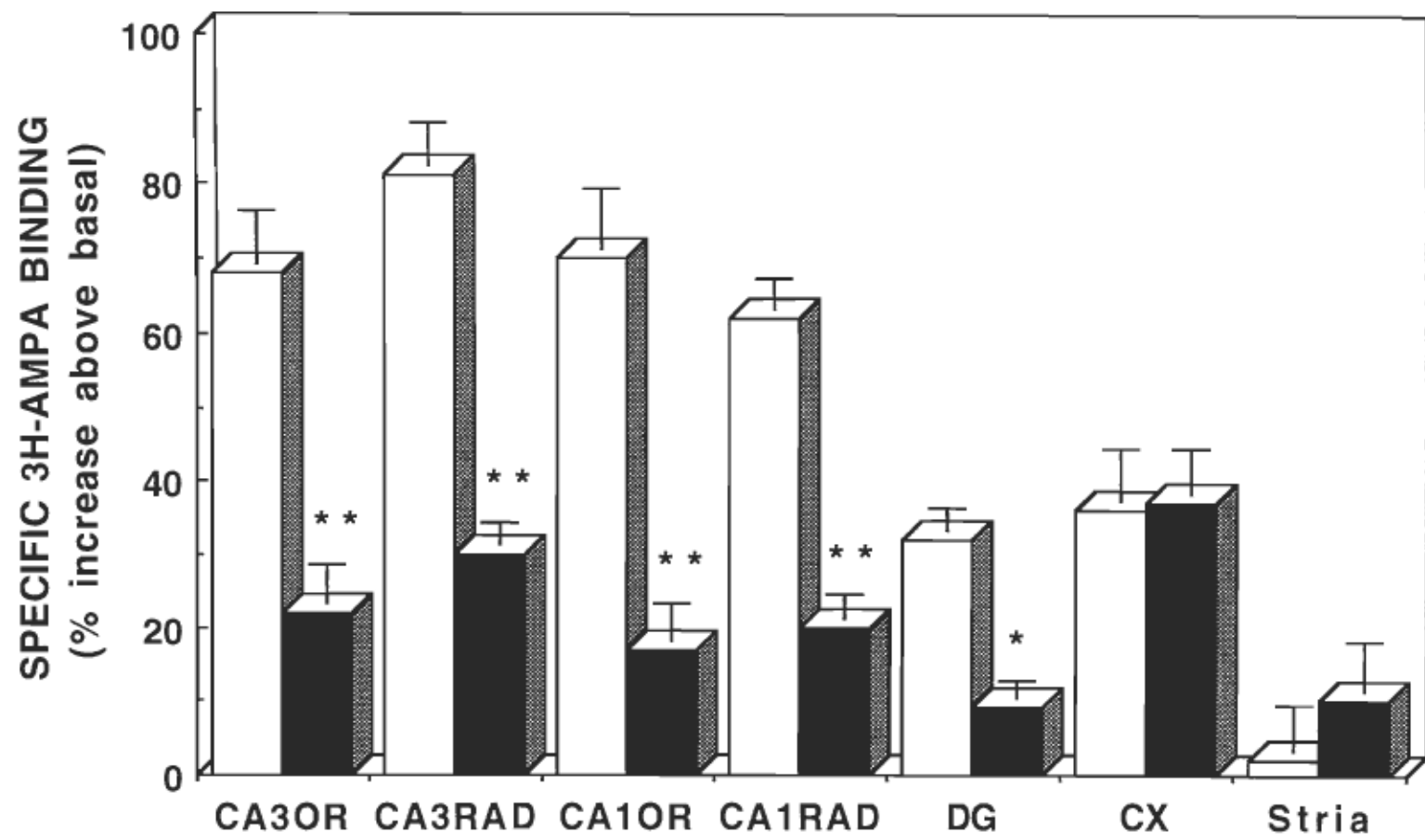
Tissue sections prepared from both control and enriched animals were preincubated in the absence or presence of 3 mM calcium (or 400 nM PS). All autoradiographs were analyzed with a digital analysis system for various hippocampal regions (OR, stratum oriens; RAD, stratum radiatum; DG, molecular layer of the dentate gyrus), the parieto-temporal cortex (CX) and the striatum (Stria). Specific binding was determined as described under Materials and Methods and the data were expressed as pmol/mg of protein. Results are means $\pm$ S.E.M. of at least 6-8 different measurements per rat with 5 different animals. *P < 0.05; **P < 0.01 versus controls, Scheffe's test.











CHAPITRE 3

Première partie

**Binding properties of glutamate receptors in
streptozotocin-induced diabetes in rats**

**Article publié dans
Diabetes 46 (1997) 841-846**

Résumé du troisième chapitre

Nous avons préalablement démontré, avec le modèle de l'enrichissement cognitif, qu'une modification du comportement de l'animal entraîne des perturbations biochimiques et électrophysiologiques des neurones sensibles à l'action du glutamate. À la lumière de ces résultats, il était donc pertinent d'évaluer si un affaiblissement cognitif de l'animal, une situation opposée à l'enrichissement cognitif, engendrait aussi certains dérèglements de la fonction glutamatergique des neurones. Pour ce faire, il existe actuellement un modèle animal expérimental intéressant puisqu'il présente des troubles au niveau de la rétention de certaines informations. Ce modèle d'affaiblissement cognitif consiste à induire le diabète mellitus chez le rat par l'injection de streptozotocine (STZ), une drogue détruisant les cellules pancréatiques sécrétrices de l'insuline. En particulier, il a été constaté que les rats traités à la STZ possèdent d'importants problèmes de performance pour les tâches visuo-spatiales. Par conséquent, dans le premier manuscrit de ce chapitre, nous avons évalué l'impact de ce modèle animal sur les propriétés de liaison des récepteurs au glutamate chez le rat. Les premiers résultats obtenus ont démontré une diminution spécifique de l'affinité des récepteurs AMPA dans le cortex, le striatum, et l'hippocampe des animaux souffrant de diabète mellitus. De plus, nous avons constaté une baisse de l'immunoréactivité pour la sous-unités GluR₁ du récepteur AMPA chez les rats traités à la STZ, tandis qu'aucune modification ne fut remarquée pour les sous-unités GluR_{2/3}. Ainsi, les données recueillies dans le cadre de la présente étude ont permis de proposer que la baisse d'affinité des

récepteurs AMPA, retrouvée chez les animaux atteints de diabète mellitus, pourrait être attribuable à un changement dans la composition moléculaire du récepteur AMPA.

Toutefois, les résultats obtenus ne permettaient pas de déterminer l'impact fonctionnel de ces perturbations biochimiques sur les neurones glutamatergiques des rats diabétiques. Dans le second manuscrit, nous avons donc tenter d'évaluer l'effet du diabète mellitus sur la capacité des neurones de l'hippocampe à produire la LTP en laboratoire. En ce sens, nos expériences montrent que la capacité des neurones glutamatergiques de l'hippocampe à produire la LTP est considérablement réduite chez les animaux diabétiques comparativement à celle générée chez les rats contrôles. De plus, les réponses synaptiques de type AMPA évoquées par stimulation sont diminuées dans l'hippocampe des rats traités à la STZ, un effet concordant avec la baisse d'affinité auparavant observée chez ces animaux.

Dans le même ordre d'idée que l'enrichissement cognitif, nous avons évalué le pouvoir que possèdent certains agents cellulaires (calcium, PLA_2 , mellétine) à moduler le récepteur AMPA sur des coupes minces de cerveaux de rats diabétiques. Fait intéressant, la régulation des récepteurs AMPA par ces divers agents, connus pour changer l'environnement lipidique de ce récepteur, est largement atténuée chez les rats traités à la STZ. Ces données suggèrent qu'une modulation inadéquate des récepteurs AMPA puisse être responsable de la perte de LTP notée chez les rats souffrant de diabète mellitus. De plus, ce problème de modulation des récepteurs AMPA pourrait être imputable à des changements de l'environnement lipidique de ce récepteur et/ou d'une composition moléculaire différente lors du développement du diabète mellitus chez le rat.

BINDING PROPERTIES OF GLUTAMATE RECEPTORS IN STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES IN RATS

Joël GAGNÉ¹, Martin MILOT², Sylvie Gélinas¹, Ahmed LAHSAÏNI¹, François
TRUDEAU², Maria-Grazia Martinoli¹, and Guy MASSICOTTE^{1,3}

Université du Québec à Trois-Rivières, Département de ¹Chimie-Biologie et des ²Sciences
de l'Activité Physique, C.P. 500,
Trois-Rivières, Québec, Canada G9A 5H7

and

³Centre de Recherche de l'Institut Philippe Pinel
10905 Est, Boulevard Henri-Bourassa,
Montréal (Québec), Canada, H1C 1H1

Key words: Streptozotocin, Hyperglycemia, Glutamate receptors, Hippocampus

Running Title: Modulation of glutamate receptors in diabetes

Abbreviations used: AMPA, (RS)-alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazolepropionic acid; CNQX, 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione; NMDA, N-methyl-D-aspartate; SITS, 4-acetanido-4'-isothiocyanato-stilbene-2,2'-disulfonic acid; STZ, Streptozotocin

Send proofs and correspondence to:

Guy Massicotte
Département de Chimie-Biologie
Université du Québec à Trois-Rivières
C.P. 500, Trois-Rivières
Québec, Canada, G9A 5H7
Phone (819) 376-5053
Fax (819) 376-5084
Guy_Massicotte@uqtr.quebec.ca

SUMMARY

The biochemical mechanisms by which diabetes modulates cognitive function are not well established. Here, we determined the effects of streptozotocin (STZ) administration on the binding properties of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazolepropionic acid (AMPA) and N-methyl-D-aspartate (NMDA) subtypes of glutamate receptors in rats, using quantitative autoradiographic analysis of ^3H -AMPA, and [^3H]glutamate binding on brain tissue sections. The STZ injection (70 mg/Kg, intraperitoneally) produced a reduction of ^3H -AMPA binding in various brain regions, an effect that is due to a decrease in receptor affinity. The STZ-induced reduction of ^3H -AMPA binding varied in different brain structures, being more pronounced in the striatum, cerebral cortex, and hippocampus and almost absent in the cerebellum. Western blots performed on hippocampal membranes revealed that the decrease in ^3H -AMPA binding is possibly associated with changes in immunological properties for one glutamate receptor subunit (GluR1). Finally, the effect of STZ-induced diabetes appeared to be specific to the AMPA subtype of glutamate receptors, as the same treatment did not modify [^3H]glutamate binding to NMDA receptors. These changes in AMPA receptor properties may have important implications for understanding biochemical mechanisms underlying cognitive impairment in diabetes.

INTRODUCTION

Perturbations in the supply of glucose to the brain as well as impairments of brain glucose metabolism are expected to modify brain function. In particular, there is some evidence that a relationship exists between diabetes and cognitive difficulties, particularly in diabetic individuals who have an early onset of the disorder (1). Furthermore, cognitive impairment in diabetes has been reported in aging patients (2), and it has been suggested that such changes may well be manifestations of premature aging of the brain associated with diabetes (3).

Most of our knowledge of behavioral and neurochemical changes in the diabetic brain is based on results obtained from rodents. Chemically induced diabetes in rodents resulting from injection of either streptozotocin (STZ) or alloxan is the most frequently used animal model. Studies on STZ-induced diabetic rodents have shown that learning of passive avoidance tasks appears to be enhanced (4, 5), while STZ-treated mice incur a marked memory retention deficit after learning a spatial memory task (T-maze paradigm) (5). Furthermore, it has been well documented that uncontrolled hyperglycemia modifies dopamine, norepinephrine, and serotonin concentrations in various brain structures of diabetic rats (6-8) as well as humans (8). Acetylcholine release and synthesis have been reported to be reduced in the striatum of STZ-induced diabetic rats (9), and altered acetylcholine metabolism has been proposed to contribute to the cognitive deficits exhibited in diabetes (10).

There is a good deal of evidence supporting the involvement of glutamate receptors in the regulation of cognitive function. Long-term potentiation (LTP), a long-lasting increase in synaptic efficacy elicited by brief, high-frequency bursts of synaptic activation, has been proposed to be involved in learning and memory in mammals (11-13). LTP induction in several brain regions requires the activation of postsynaptic N-methyl-D-aspartate (NMDA)

receptors (14, 15), a subclass of glutamate receptors, and a consequent rise in intracellular calcium concentration (16, 17). Furthermore, LTP expression appears to be partly mediated by a modification of postsynaptic currents elicited by the α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazolepropionate (AMPA) subtype of glutamate receptors (18-20). Moreover, it has been proposed that inappropriate regulation of AMPA receptor properties could be a major factor in conditions characterized by LTP and memory deficits (11, 21). Whether modifications of glutamate receptors are related to memory deficits in diabetes remain undetermined. Here, we report that AMPA receptor properties in the rat brain are selectively modulated by STZ treatment.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Hyperglycemia production and tissue preparation.

Male Sprague-Dawley rats (n=16), ~10 weeks of age (200-300 g), were obtained from Charles River (Anilab, Québec City, Québec) and individually housed under a 12-h day and night cycle with food and water ad libitum. STZ (Sigma, St. Louis, MO; 70 mg/Kg in citrate buffer, pH 4.5) was administered to induce chronic hyperglycemia (glucose levels ≥ 25 mmol/l, n=10). Normoglycemic controls (n=6) were injected intraperitoneally with an equivalent volume of citrate buffer. Control and STZ-treated rats were killed 6 weeks after the injection. Blood was collected and brains quickly removed and frozen in isopentane (methyl butane) at -20°C , then kept at -70°C until they were sectioned. Horizontal 14- μm sections were cut in a cryostat and thaw-mounted on chrome-alum gelatin-coated slides. Hippocampal membranes were prepared as previously described (22), using differential centrifugation and osmotic lysis.

Binding assays for glutamate receptors.

Adjacent sections were preincubated for 60 min in 50 ml of Tris-acetate buffer (100 mmol/l, pH 7.4) containing 100 $\mu\text{mol/l}$ EGTA at 35°C . They were then processed for ^3H -AMPA and [^3H]glutamate binding as described previously (23). For ^3H -AMPA binding, the sections were incubated for 45 min at $0-4^{\circ}\text{C}$ in Tris-acetate buffer (50 mmol/l, pH 7.4; 100 μM EGTA) containing 50 mmol/l potassium thiocyanate in the presence of 75 nM ^3H -AMPA (specific activity 53 Ci mmol $^{-1}$, NEN-Dupont, Wilmington, DE). For [^3H]glutamate binding to NMDA receptors, the sections were incubated with 100 nmol/l of [^3H]glutamate (51 Ci mmol $^{-1}$, NEN-Dupont) for 45 min at $0-4^{\circ}\text{C}$ in Tris-acetate buffer (50 mmol/l, pH 7.4; 50 μM EGTA) containing 5 $\mu\text{mol/l}$ AMPA, 1 $\mu\text{mol/l}$ kainic acid, and 10 $\mu\text{mol/l}$ quisqualate to eliminate glutamate binding to non-NMDA sites and 100 $\mu\text{mol/l}$ 4-acetamido-4'-isothiocyanato-stilbene-2,2'-disulfonic acid (SITS) to block glutamate uptake sites.

Sections as well as tritium standards (ARC, St.-Louis, MO) were exposed to tritium-sensitive film (Amersham Hyperfilm, U.K.) for 7 days (^3H -AMPA) or 14 days (^3H]glutamate). The films were processed in Sigma developer and fixer. Optical densities (ODs) of different brain regions were converted to radioactive units, using tritium standards on the film after measurement with an image analysis system (Imaging Research, Ontario, Canada). ANOVA was followed by Scheffe posthoc analysis with conventional criteria of statistical significance: p values < 0.05 . In some experiments, binding of increasing concentrations of ^3H -AMPA was measured in membrane suspensions to determine the effect of STZ treatment on the characteristics of ^3H -AMPA binding. Data from these experiments were analyzed by the LIGAND program to generate K_d and B_{max} .

Electrophoresis and immunoblotting of AMPA receptor subunits.

Western blot analysis was performed on hippocampal membranes from control and STZ-treated rats. Membranes were prepared and kept frozen in 10 mmol/l Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 320 mmol/l sucrose, 1 mmol/l EDTA, 5 mmol/l EGTA, 100 $\mu\text{mol/l}$ leupeptine, and 100 $\mu\text{mol/l}$ PMSF. The day of the experiment, aliquots of the membrane preparations were subjected to SDS-PAGE (8% polyacrylamide) performed according to the method of Laemmli (24). Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes as described by Towbin et al. (25). Membranes were first incubated for 1 h at room temperature in Tris-buffered saline containing 1% of blocking serum and then incubated with primary antibodies against glutamate receptor subunit 1 (GluR1) (0.5 $\mu\text{g/ml}$) or GluR2/3 (0.5 $\mu\text{g/ml}$) (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) in Tris-buffered saline containing 0.5% of blocking serum and 0.05% Tween-20. Bands corresponding to GluR1 or 2/3 were detected with peroxidase-conjugated secondary antibody (Boehringer Mannheim Canada, Laval, Québec). The intensity of immunoreactive bands was quantified densitometrically using a

computer imaging system (Imaging Research) and normalized to the concentration of protein in each sample.

RESULTS

Quantitative ^3H -AMPA and ^3H -CNQX binding autoradiography of rat horizontal sections: effect of STZ-induced diabetes

To evaluate the effects of diabetes on the biochemical properties of glutamate receptors, we performed ligand-binding autoradiography on brain sections from control and STZ-induced diabetic rats (glucose levels ≥ 25 mmol/l) for both AMPA and NMDA subtypes of these receptors. Horizontal sections from control and STZ-diabetic rats were preincubated at 35°C for 60 min in Tris-acetate buffer. Following washes in the same buffer, ^3H -AMPA binding was performed in the presence of 50 mmol/l KSCN (potassium thiocyanate), and the sections were then processed for autoradiography. Visual examination of representative autoradiography clearly indicated decreased binding in the hippocampus, cerebral cortex, and other brain structures (Figs. 1A and 1B). The images were quantitatively analyzed with an image analyzing system, and the data from several sections were averaged. The results indicated that the decrease of ^3H -AMPA binding produced by STZ-induced diabetes in rats was uniformly distributed in all regions of the hippocampus (Fig. 1C). STZ elicited a significant decline of around 30% in ^3H -AMPA binding to CA3 and CA1 strata radiatum and oriens of the hippocampus; a similar fall (30-40%) was also observed in the dentate gyrus, striatum and cerebral cortex. The molecular and granular layers of the cerebellum showed the smallest reduction of ^3H -AMPA binding (5%).

Saturation experiments on hippocampal membranes were performed to determine whether the decreased ^3H -AMPA binding generated by STZ treatment was the consequence of a change in affinity (K_d) or in the number of binding sites (B_{max}). The result indicated that the decrease in binding was due to a decrease in affinity for the low-affinity component of AMPA receptors (K_d , 385 ± 35 nmol/l in control membranes vs. 239 ± 28 nmol/l in STZ-treated membranes [means ± 4 experiments]; $P < 0.05$ by Student's t test) without significant

changes in the maximal number of sites (B_{max} , 16.8 ± 1.5 pmol/mg protein in control membranes vs 15.5 ± 1.8 pmol/mg protein in STZ-treated membranes). To determine whether the STZ-induced changes in AMPA receptor affinity was specific, we measured [3H]glutamate binding to NMDA receptors. Binding of 100 nmol/l [3H]glutamate was determined in the presence of 1.0 μ mol/l kainate, 5 μ mol/l AMPA, and 10 μ mol/l quisqualate in order to eliminate the non-NMDA binding receptor component and 100 μ mol/l SITS to block reuptake glutamate system. Under these conditions, most of the [3H]glutamate binding represents binding to the NMDA receptor. No significant alteration of [3H]glutamate binding to NMDA receptors was observed in STZ-treated rats (Figs. 2A and 2B). Quantification and averaging of data obtained from several sections confirmed the visual examination and revealed no substantial changes in [3H]glutamate binding in various brain regions following STZ treatment (Fig. 2C).

Effect of STZ-induced diabetes on GluR1 and GluR2/3 immunolabeling in hippocampal synaptic membranes.

The recent cloning of receptor subunit (GluR1-4) has allowed more investigation into the distribution and stoichiometry of AMPA receptors. To determine the nature of the biochemical changes associated with the diabetes-induced reduction in 3H -AMPA binding, we performed studies on the effect of STZ on the immunologic properties of the three AMPA receptor subunit (GluR1-3) present in the hippocampal structure. Immunological analysis of synaptic membranes revealed that anti-GluR1 and anti-GluR2/3 antibodies recognized bands with molecular weight of around 106 kDa, which corresponds to the molecular mass on the GluR1 and GluR2/3 subunits (Fig. 3). After STZ-induced diabetes, the amount of immunoreactivity for GluR1 was reduced by 25% (OD, 0.38 ± 0.01 in control vs. 0.27 ± 0.012 in STZ-treated rats [means $\pm$ 4 experiments]; $P < 0.05$ by Student's *t* test), while no

significant alteration in GluR2/3 immunoreactivity was observed (OD, 0.42 ± 0.02 in control vs. 0.43 ± 0.015 in STZ-treated rats [means $\pm$ 4 experiments]).

DISCUSSION

In this study, we presented evidence that STZ-induced diabetes modifies the properties of the AMPA subtype of glutamate receptors by decreasing ^3H -AMPA binding in various brain structures. To the best of our knowledge, no one has directly investigated changes of glutamate receptor properties in response to diabetes. Nakashima et al. (26) did report a decrease of muscarinic cholinergic receptors in the brain following STZ treatment, while Trucson and Himmel (27) observed an increased number of dopamine receptors in the limbic forebrain and striatum. Furthermore, Bitar and DeSouza (28) also noted a significant alteration of $\beta 1$ -adrenoceptors in STZ-treated rats. The reduction of ^3H -AMPA binding seen in the present study does not appear to be due to a major loss of neurons in STZ-treated rats. The modifications produced by STZ seemed to be only specific to AMPA receptors, as [^3H]glutamate binding to the NMDA receptor complex was not affected. Moreover, the characteristics of the effect, i.e., reduced affinity for ^3H -AMPA binding, suggest that STZ administration changes the conformation but not the number of sites for AMPA receptors. It is possible that irreversible alteration of structural elements, such as membrane lipids and cytoskeletal proteins, is associated with selective changes of ^3H -AMPA binding in STZ-treated rats. In particular, the phospholipid concentration can be affected by diabetes (29, 30), and some studies have demonstrated an increase glycation of brain actin in STZ-treated rats (31). Moreover, lipid peroxidation byproducts, such as conjugated dienes, were reported to be increased in synaptic membranes from STZ-treated rats (30). Since peroxydation of membrane lipids can generate cross-linking of lipids and proteins, it is thus possible to speculate that AMPA receptors may be more susceptible to membrane alterations in diabetic rats. This interpretation is supported by results demonstrating that various agents producing modifications of both the lipid and protein environments of synaptic membranes are capable of inducing selective changes of the AMPA receptor complex (18).

Recent results have revealed that metabolites generated by the 12-lipoxygenase pathway of arachidonic acid (AA) metabolism may reduce the synaptic efficacy of glutamatergic neurons in area CA₁ of the hippocampus (32), whereas AA application to freshly-isolated hippocampal pyramidal cells was shown to decrease the current produced by iontophoresed AMPA (33). Phospholipase A₂ (PLA₂) treatment of juvenile synaptic membranes (18) was found to evoke a diminution of agonist binding to AMPA receptors similar to that described here, and recent studies performed in our laboratory demonstrated that the PLA₂-induced decline of AMPA receptor affinity in rat synaptoneurosomes is mediated by both 5- and 12-lipoxygenase metabolites of AA (unpublished observations). Whether the formation of lipoxygenase metabolites of AA may be involved in the decrease of AMPA receptor affinity in the brain of diabetic animals has yet to be determined. In this respect, it is noteworthy that diabetes in rats was shown to be associated with increased lipoxygenase AA metabolite production in non-neuronal tissues (34, 35). Alternatively, intracerebroventricular administration of STZ has been found to reduce ATP and phosphocreatine concentrations as well as the ATP/ADP ratio in rats (36). As alterations in brain ATP concentrations are expected to modify the activity of various ATP-dependent protein kinases (31), and AMPA receptors possess phosphorylation sites (37, 38), the marked decrease of ATP may be another factor producing receptor changes in diabetes.

The effect of STZ treatment on AMPA binding reported in the present study is also different in various brain structures, being larger in the striatum and almost absent in the molecular layer of the cerebellum. The mechanism underlying these regional differences are unknown, although it is noteworthy that acetylcholine synthesis was also reported to be selectively reduced in striatal slices from STZ-treated rats (9). One possible explanation could be that STZ treatment differentially modifies the expression of various genes coding for AMPA receptors. In the brain, AMPA receptors subunits (GluR1-4) are coded by multiple

genes, and it has been postulated that the AMPA receptor is a heteromeric molecule composed of a combination of different subunits (39). Here, we may assume that the significant modification of AMPA receptor affinity may reflect the differential expression of receptor subunits in various brain structures of diabetic rats. The present results indicating that STZ treatment was associated with a selective reduction of GluR1 immunoreactivity in the hippocampus are certainly consistent with this interpretation. However, recent studies have shown that a selective decrease in GluR1 immunoreactivity may be also reproduced by treatment of brain sections with calcium-dependent proteases (40), suggesting that changes in immunological properties are not necessarily due to the differential expression of AMPA receptor subunits. Further experiments will be directed at this question.

Identifying the mechanisms by which STZ exerts its effects on glutamate receptor function may thus provide clues about the cellular events responsible for memory deficits in diabetic patients. Previous studies have shown that diabetic animals present a marked memory retention deficit after learning an active avoidance T-maze task (5), and our results suggest that functional alterations of glutamatergic neurons in various brain structures may be associated with the effects of diabetes on cognitive function. Because there is evidence implicating LTP as a substrate for certain types of memory, it is certainly important to evaluate whether the biochemical modifications of AMPA receptor properties observed in STZ-treated rats are linked with changes in LTP magnitude in the hippocampus or other brain structures.

Acknowledgement: This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to G.M. and M.-G.M. J.G. holds a Studentship from the NSERC.

REFERENCES

1. Ryan C, Vega A and Drash A: Cognitive deficits in adolescents who developed diabetes early in life. *Pediatrics* 75:921-927, 1985
2. Mooradian AD, Perryman K, Fitten J, Kavonian G and Morley JE: Cortical function in elderly non-insulin dependent diabetic patients: Behavioral and electrophysiological studies. *Arch. Int. Med.* 148:2369-2372, 1988
3. Mooradian AD: Tissue specificity of premature aging in diabetes mellitus. The role of cellular replicative capacity. *J. Am. Geriatr. Soc.* 36:831-839, 1988
4. Bellush LL and Rowland NE: Stress and behavior in streptozotocin diabetic rats: Biochemical correlates of passive avoidance learning. *Behavi. Neurosci.* 103:144-150, 1989
5. Flood JF, Mooradian AD and Morley JE: Characteristics of learning and memory in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* 39:1391-1398, 1990
6. Bitar M, Koulu M, Rapoport SI and Linnoila M: Diabetes-induced alteration in brain monoamine metabolism in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 236:432-437, 1985
7. Chu PC, Lin MT, Shian LR and Leu SY: Alterations in physiologic functions and in brain monoamine content in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetes* 35:481-484, 1986
8. Lackovic Z, Salkovic M, Kuci S and Relja M: Effect of long-lasting diabetes mellitus on rat and human brain monoamines. *J. Neurochem.* 54:143-147, 1990

9. Welsh B and Wecker L: Effects of streptozotocin-induced diabetes on acetylcholine metabolism in rat brain. *Neurochem. Res.* 16:453-460, 1991
10. Mooradian AD: Blood-brain barrier choline transport is reduced in diabetic rats. *Diabetes* 36:1094-1097, 1987
11. Massicotte G and Baudry M: Triggers and substrates of hippocampal synaptic plasticity. *Neuro. Biobehav. Rev.* 15:415-423, 1991
12. Morris RGM, Anderson E, Lynch GS and Baudry M: Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by the N-Methyl-D-Aspartate receptor antagonist, AP-5. *Nature* 319:774-6, 1986
13. Staubli U, Thibault O, DiLorenzo M and Lynch G: Antagonism of NMDA receptors impairs acquisition but not retention of olfactory memory. *Behav. Neurosci.* 103:54-60, 1989
14. Collingridge GL, Kehl SJ and McLennan H: Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J Physiol Lond* 334:33-46, 1983
15. Larson J and Lynch G: Role of N-Methyl-D-Aspartate receptors in the induction of synaptic potentiation by burst stimulation patterned after the hippocampal theta rhythm. *Brain Res.* 441:111-8, 1988

16. Lynch G, Larson J, Kelso S, Barrionuevo G and Schottler F: Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation. *Nature* 305:20-26, 1983
17. Malenka RC, Kauer JA, Zucker RS and Nicoll RA: Postsynaptic calcium is sufficient for potentiation of hippocampal synaptic transmission. *Science* 242:81-4, 1988
18. Davies SN, Lester RA, Reymann KG and Collingridge GL: Temporally distinct pre- and post-synaptic mechanisms maintain long-term potentiation. *Nature* 338:500-503, 1989
19. Kauer JA, Malenka RC and Nicoll RA: A persistent postsynaptic modification mediates long-term potentiation in the hippocampus. *Neuron* 1:911-7, 1988
20. Muller D, Joly M and Lynch G: Contributions of quisqualate and NMDA receptors to the induction and expression of LTP. *Science* 242:1694-7, 1988
21. Massicotte G, Vanderklish P, Lynch G and Baudry M: Modulation of AMPA/Quisqualate receptors by Phospholipase A2: a necessary step in long-term potentiation. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 88:1893-1897, 1991
22. Massicotte G, Kessler M, Lynch G, Baudry M: N-methyl-D-aspartate and quisqualate/AMPA receptors: differential regulation by phospholipase C treatment. *Mol Pharmacol* 32:278-285, 1990
23. Tocco G, Massicotte G, Standley S, Thompson RF, Baudry M: Effect of temperature and calcium on the binding properties of the AMPA receptor in frozen rat brain sections. *Eur J Neurosci* 4:1093-1103, 1992

24. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685, 1970
25. Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheet: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350-4354, 1979
26. Nakashima E, Ishizaki J, Takeda M, Matsushita R, Yokogawa K and Ichimura F: Pharmacokinetics of anticholinergic drugs and brain muscarinic receptor alterations in streptozotocin diabetic rats. *Biopharm. Drug Dispo.* 14:673-684, 1993
27. Trulson ME and Himmel CD: Decreased brain dopamine synthesis rate and increased 3H-spiroperidol binding in streptozotocin-diabetic rats. *J. Neurochem.* 40:1456-1459, 1983
28. Bitar MS and DeSouza EB: Diabetes-related changes in brain beta adrenoreceptors in rats as assessed by quantitative autoradiography: Relationship to hypothalamic norepinephrine metabolism and pituitary-gonadal hormone secretion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 254:781-785, 1990
29. Makar TK, Hungund BL, Cook GA, Kashfi K and Cooper AJL: Lipid metabolism and membrane composition are altered in the brains of type II diabetic mice. *J. Neurochem.* 64:2159-2168, 1995
30. Mooradian AD, Dickerson F and Smith TL: Lipid order and composition of synaptic membranes in experimental diabetes mellitus. *Neurochem. Res* 15:981-985, 1990

31. McLean WG, Pekiner C, Cullum NA and Casson IF: Posttranslational modifications of nerve cytoskeletal proteins in experimental diabetes. *Mol. Neurobiol.* 6:225-237, 1992
32. Normandin M, Gagné J, Bernard J, Élie R, Miceli D, Baudry M and Massicotte G: Involvement of the 12-lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism in homosynaptic long-term depression of the rat hippocampus. *Brain Res.* in press
33. Kovalchuk Y, Miller B, Sarantis M and Attwell D: Arachidonic Acid Depress non-NMDA Receptor Currents. *Brain Res.* 643:287-295, 1994
34. Rosello-Catafau J, Hotter G, Closa D, Ortiz MA, Pou-Torello JM, Gimeno M, Bioque G and Gelpi E: Liver lipoxygenase arachidonic acid metabolites in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Prost. Leuk. Essent. Fatty Acids* 51:411-413, 1994
35. Rosello-Catafau J, Closa D, Hotter G, Bulbena O, Ortiz MA, Pou-Torello JM, Gimeno MAF and Gelpi E: Pancreas lipoxygenase arachidonic acid metabolites production in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Horm. Metab. Resh.* 26:387-388, 1994
36. Nitsch R and Hoyer S: Local action of the diabetogenic drug, streptozotocin, on glucose and energy metabolism in rat brain cortex. *Neurosci. Lett.* 128:199-202, 1991
37. Yakel JL, Vissavajhala P, Derkach VA, Brickey DA and Soderling TR: Identification of a Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II regulatory phosphorylation site in non-N-methyl-D-aspartate glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 92:1376-1380, 1995

38. Nakazawa K, Mikawa S, Hashikawa T and Ito M: Transient and persistent phosphorylation of AMPA-type glutamate receptor subunits in cerebellar purkinje cells. *Neuron* 15:697-709, 1995
39. Hollman M, Heinemann S: Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17:31-108, 1994.
40. Bi X, Tocco G, Baudry M: Calpain-mediated regulation of AMPA receptors in adult rat brain. *Neuroreport* 6:61-64, 1994

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Effect of STZ treatment on ^3H -AMPA binding in horizontal sections.

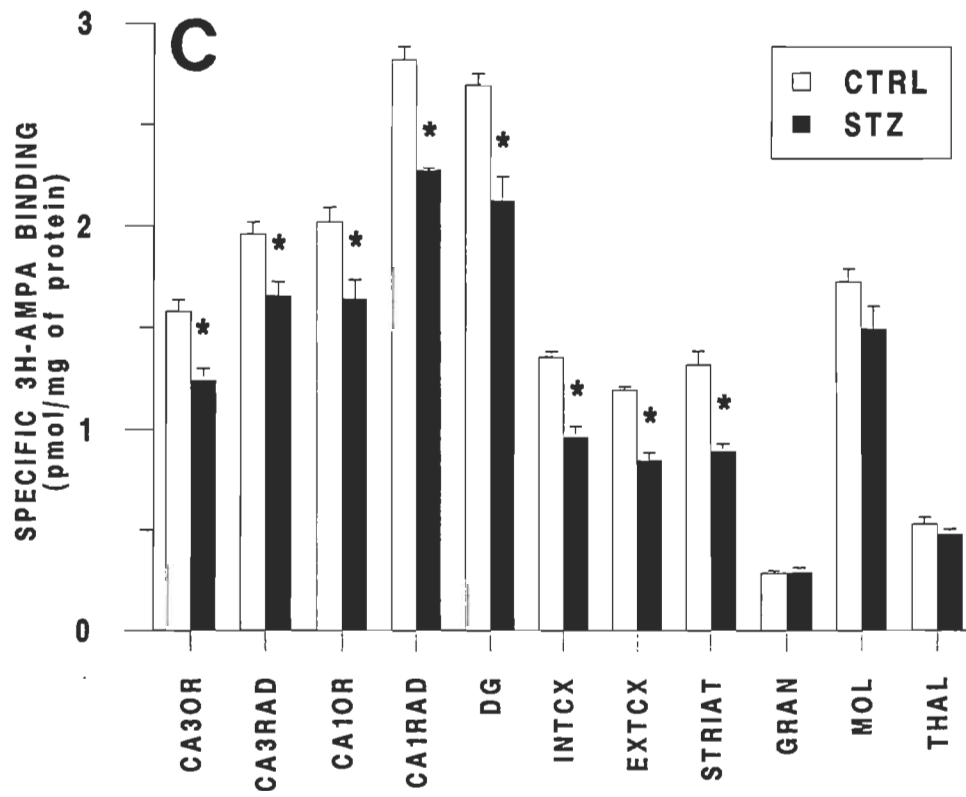
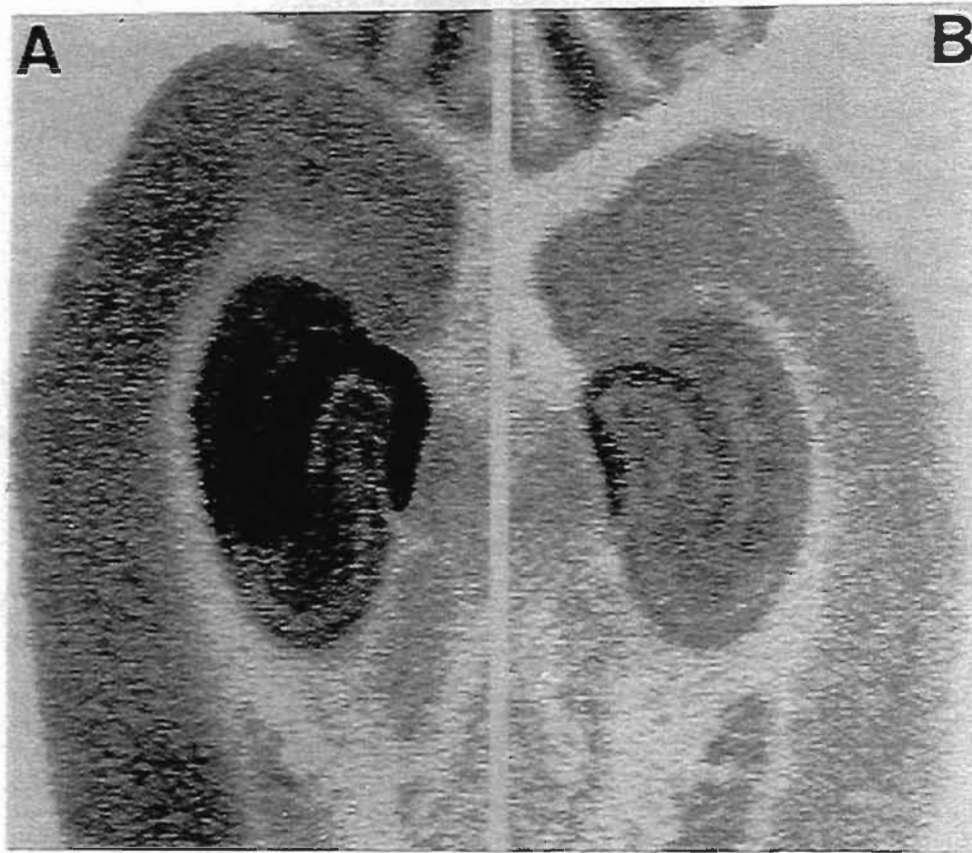
Adjacent horizontal sections from control (A) and STZ-treated (B) rats were preincubated at 35°C for 1 h in Tris-acetate buffer (100 mmol/l, pH 7.4, containing 100 $\mu\text{mol/l}$ EGTA). They were then washed in buffer alone and processed for ^3H -AMPA binding as described in METHODS. C: autoradiographs shown in Figs. 1A and 1B were assessed with an image analysis system, and the results are expressed in pmol/mg of protein obtained for different regions of the rat brain. OR, stratum oriens; RAD, stratum radiatum; DG, molecular layer of the dentate gyrus; INTCX, inner layers (III-VI) of the parieto-temporal cortex; EXTCX, outer layers (I-II) of the same cortex; STRIAT, striatum; GRAN, granular layer of the cerebellum; MOL, molecular layer of the cerebellum; THAL, thalamic nuclei. Data are means $\pm$ SE of at least eight different measurements per rat, with six different rats. ^3H -AMPA binding is reduced compared with control by STZ in the different brain regions ($F[11, 109] = 5.75$; $P < 0.02$). * $P < 0.05$ vs. control, Scheffe's test.

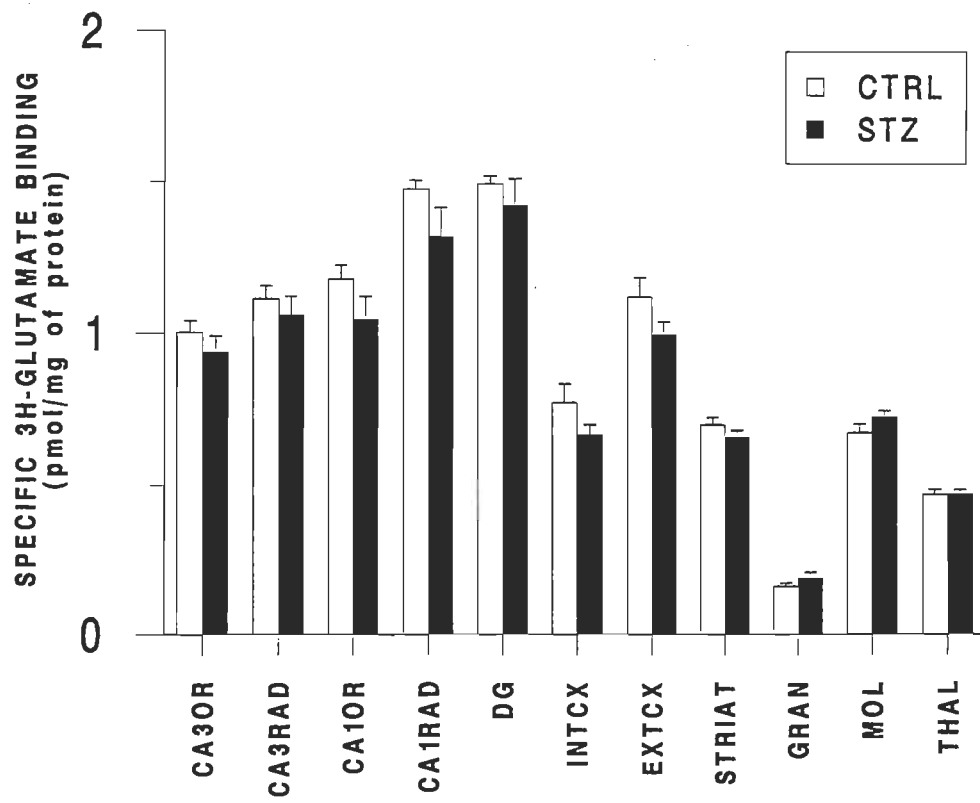
Figure 2: Effect of STZ treatment on [^3H]glutamate binding to the NMDA site in horizontal sections.

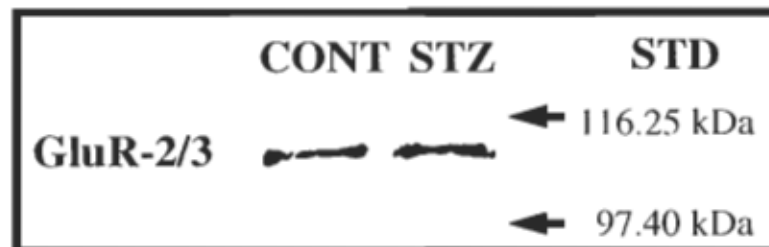
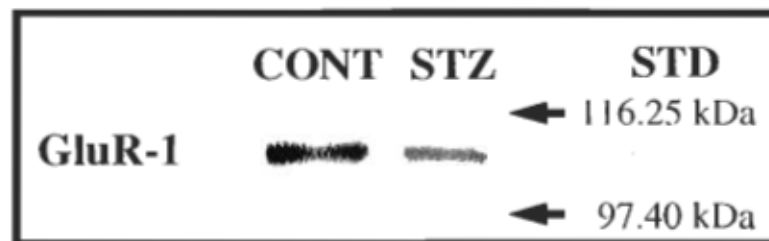
Adjacent horizontal sections from control (A) and STZ-treated (B) rats were preincubated at 35°C for 1 h in Tris-acetate buffer (100 mmol/l, pH 7.4, containing 100 $\mu\text{mol/l}$ EGTA). They were then washed in buffer alone and processed for [^3H]glutamate binding to the NMDA subtype of glutamate receptors as described in METHODS. C: autoradiographs as shown in Figs. 2A and 2B were assessed as described in Fig. 1, and the results are expressed in pmol/mg of protein obtained for different regions of the rat brain. Data are means $\pm$ SE of at least eight different measurements per rat, with six different rats. [^3H]glutamate binding to NMDA receptor is not affected compared with control by STZ in the different brain regions ($F[11, 109] = 0.40$; $P > 0.50$).

Figure 3: Effect of STZ treatment on GluR1 and GluR2/3 in hippocampal membranes.

Hippocampal membrane (15 µg/lane) were subjected to SDS-PAGE and immunoblotted with anti-GluR1 antibodies. Right arrows indicate molecular weight standards. Each anti-peptide anti-body detected a single major immunoreactive band at approximately 106 kDa in both and STZ-treated rats. After STZ treatment, the immunoreactivity diminished appreciably for GluR1.







CHAPITRE 3

Deuxième partie

**Impaired modulation of AMPA receptors by calcium-
dependent processes in streptozotocin-induced diabetic
rats**

**Article publié dans
Brain Research 768 (1997) 249-256**

IMPAIRED MODULATION OF AMPA RECEPTORS BY CALCIUM-DEPENDENT PROCESSES IN STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIC RATS

Chantale CHABOT¹, Guy MASSICOTTE^{1,3}, Martin MILOT², François TRUDEAU², and Joël GAGNÉ¹

Université du Québec à Trois-Rivières, Département de ¹Chimie-Biologie et des
²Sciences de l'Activité Physique
C.P. 500, Trois-Rivières
(Québec) Canada G9A 5H7

³Centre de Recherche de l'Institut Philippe Pinel
10905 Est, Boulevard Henri-Bourassa
Montréal (Québec) Canada H1C 1H1

Key words: Streptozotocin, Glutamate receptors, Hippocampus, PLA₂

Theme: Neurotransmitters, modulators, transporters, and receptors
- Excitatory amino acid receptors: physiology, pharmacology and modulation

Send proofs and correspondence to:

Guy Massicotte
Département de Chimie-Biologie
Université du Québec à Trois-Rivières
C.P. 500, Trois-Rivières
Québec, Canada G9A 5H7
Phone (819) 376-5053
Fax (819) 376-5216
Guy_Massicotte@uqtr.quebec.ca

SUMMARY

The mechanisms by which diabetes impairs cognitive function are not well-established. In the present study, we determined the electrophysiological and biochemical nature of disturbances in the mechanism of long-term potentiation (LTP) in diabetic rats. As previously reported, the administration of streptozotocin (STZ) was found to reduce the magnitude of LTP in the CA₁ region of the hippocampus, while the same treatment did not interact with the capacity of the hippocampus to generate long-term depression induced by low-frequency stimulation. In addition, STZ treatment did not modify the component of excitatory postsynaptic potentials mediated by activation of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) subtype of glutamate receptors, suggesting that NMDA receptor function remained intact in STZ-treated slices. At the biochemical level, the capacity of calcium to increase ³H-(RS)- α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole propionic acid (³H-AMPA) binding to glutamate/AMPA receptors in rat brain tissue sections was markedly affected in most regions of the hippocampus of STZ-treated rats. Moreover, changes in ³H-AMPA binding properties elicited by both exogenous phospholipase A₂ and melittin, a potent activator of endogenous phospholipases, were also altered in synaptoneurosomes from diabetic rats. Taken together, the present data suggest that the loss of LTP maintenance in STZ-treated rats is more likely the result of disruption of calcium-dependent processes that are suspected to modulate postsynaptic AMPA receptors during synaptic potentiation. Understanding the biochemical factors participating in the impairment of AMPA receptor modulation might provide important clues revealing the very basis of memory deficits in diabetes.

INTRODUCTION

Long-term potentiation (LTP) is an increase in synaptic transmission induced by high-frequency stimulation (HFS) applied to afferent pathways. Considerable interest in this form of synaptic potentiation in the hippocampus has been generated by its characteristics which suggest a possible link to memory storage processes [33,40,51]. For example, spatial learning, which appears to be dependent on the integrity of hippocampal structure, has been proposed to involve LTP formation in area CA₁ of the hippocampus [40,41]. Moderate impairment in cognitive function has been recognized as a complication of diabetes [16,19,47,54] and a recent study using streptozotocin (STZ)-induced diabetes has demonstrated that spatial learning is impaired in severely hyperglycemic rats when compared with non-diabetic controls [7]. Interestingly, STZ administration in rats was recently shown to interact with the formation of LTP in the CA₁ of hippocampal slices by reducing LTP magnitude generated after HFS [7]. The biochemical nature of this disturbance in the mechanism of LTP in diabetes, however, remains to be determined.

It is now well-documented that the induction of LTP in area CA₁ of the hippocampus requires sufficient dendritic depolarization to activate the N-methyl-D-aspartate (NMDA) subtype of glutamate receptors to produce calcium influx into postsynaptic structures [1,2,44]. This rise in calcium concentration is critical to the generation of LTP, and several hypotheses implicating both pre- and postsynaptic processes have been advanced to explain LTP expression in various brain regions. At the presynaptic level, changes in synaptic efficacy during LTP may be caused by alterations in the amount of transmitter release, which requires the existence of retrograde messengers generated by postsynaptic neurons and acting on presynaptic terminals [18,58,60]. At the postsynaptic level, LTP has been related to specific modifications in binding properties [5,31,52] and synaptic currents mediated by the AMPA subtype of glutamate receptors [12,23,42]. In particular, recent studies have shown

that LTP expression may involve the uncovering of functional AMPA receptors that, prior to LTP, are either not present in postsynaptic membranes or are electrophysiologically silent [22,26].

Several arguments have been advanced to support the hypothesis that activation of calcium-dependent enzymes may be part of the molecular mechanisms involved in the appearance of new functional AMPA receptors in LTP [4,9]. In particular, we found that treatment of synaptic membranes with calcium-dependent phospholipases results in increased binding of the agonist to AMPA receptors [32,36], an effect also observed following synaptic potentiation in the hippocampus [5,31,52]. In the present study, we investigated the biochemical and electrophysiological properties of glutamate receptors in STZ-induced diabetic rats and tested the hypothesis that STZ interacts with the biochemical mechanisms of LTP expression. In particular, we determined the effects of STZ on the capacity of calcium-dependent processes to modulate ^3H -AMPA binding in the hippocampus.

MATERIALS AND METHODS

Hyperglycemia production

Male Sprague-Dawley rats (n=16), approximately 10 weeks of age (200-300 g), were obtained from Charles River (Anilab, Québec City, Québec) and individually housed under a 12-h day and night cycle with food and water *ad libitum*. STZ (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO; 70 mg/kg in citrate buffer, pH 4.5) was administered IP to induce chronic hyperglycemia (glucose levels ≥ 25 mM, n=10). Normoglycemic controls (n=8) were injected IP with an equivalent volume of citrate buffer.

Hippocampal slice preparation for electrophysiology

Six-8 weeks after treatment, all animals were sacrificed by decapitation and hippocampal slices were prepared as described previously [35,46]. Briefly, transverse slices (450 μ m thick) were placed in an interface chamber at 34°C in artificial cerebrospinal fluid (ACSF) medium containing (in mM) NaCl 124, KCl 5, Na₂PO₄ 1.25, MgCl₂ 1.5, CaCl₂ 2.5, NaHCO₃ 26 and glucose 10. They were exposed to a humidified atmosphere of 95% O₂/5% CO₂ and perfused continuously at a flow rate of 1 ml/min. After a 1-h equilibration period, a glass recording electrode (1-5 M Ω ; filled with 2 M NaCl) was positioned in the stratum radiatum of area CA₁ to record the population of excitatory postsynaptic potentials (EPSPs) evoked by a bipolar stimulating electrode (twisted 60 μ m nichrome), activating fibers of the Schaffer-commissural system [46]. After a 10-min baseline period, during which responses were recorded every 30 sec, high- (10 bursts of four stimulations at 100 Hz given at 200 msec intervals; HFS) or low (1500 pulses at 5 Hz; LFS) frequency stimulation was applied to generate LTP and long-term depression (LTD), respectively. The responses were then elicited every 20 sec and quantified by calculating the initial slope of the resulting EPSP. LTP and LTD were determined as the percentage change of the initial slope of the EPSP population (average of 2 responses), relative to the baseline average recording during

the baseline period. In some cases, the magnesium concentration in the medium was reduced to 50 μM , and 30 μM DNQX (6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione) was added in order to reveal the component of synaptic transmission mediated by the NMDA receptors; under these conditions, Schaffer-commissural fibers were cut between areas CA₁ and CA₃. In this condition, NMDA-mediated responses were evoked at different stimulus intensities (100, 200, 300, 400, 500 and 600 μA) and compared to AMPA-mediated synaptic transmission evoked in the presence of ACFS only.

Autoradiography and binding assays for AMPA receptors

Control and STZ-injected rats were sacrificed 6-8 weeks after treatment. Their brains were removed quickly and frozen in isopentane (methyl butane) at -20°C , then kept at -70°C until they were sectioned. Adjacent sections were preincubated for 60 min in 50 ml of Tris-acetate buffer (100 mM, pH 7.4) containing 100 μM EGTA with and without 3 mM calcium acetate at 35°C . They were then processed for ^3H -AMPA binding as described previously [53]. For ^3H -AMPA binding, the sections were incubated for 45 min at $0-4^{\circ}\text{C}$ in Tris-acetate buffer (50 mM, pH 7.4; 100 μM EGTA) containing 50 mM potassium thiocyanate in the presence of 75 nM ^3H -AMPA (specific activity 53 Ci mmol^{-1} , NEN-Dupont, Wilmington, DE). Sections as well as tritium standards (ARC, St. Louis, MO) were exposed to tritium-sensitive film (Amersham Hyperfilm) for 7 days (^3H -AMPA). The films were processed in Sigma developer and fixer. Optical densities of different brain regions were converted to radioactive units, using tritium standards on the film after measurement with an image analysis system (Imaging Research, Ontario, Canada). ANOVA was followed by Scheffe posthoc analysis with conventional criteria of statistical significance: p values < 0.05 .

In some experiments, synaptoneurosomes were prepared as described previously [20] and incubated at 32°C for 40 min with and without 10 µg/ml of phospholipase A₂ (PLA₂) or melittin. At the end of incubation, the synaptoneurosomes were centrifuged at 20,000 x g for 15 min and the supernatants were discarded. The pellets were resuspended in 100 mM Tris-acetate buffer (pH 7.4) containing 100 µM EGTA. They were washed twice by 2 cycles of centrifugation/resuspension under the same conditions, and the final membrane suspension was used for binding assays. ³H-AMPA (specific activity 53 Ci/mmol; NEN) binding assays were performed as described previously [32], with non-specific binding defined as the amount of binding measured in the presence of 0.2 mM glutamate.

RESULTS

LTP and LTD characteristics in hippocampal slices from STZ-treated rats

Hippocampal slices prepared from control and STZ-injected rats (6-8 weeks post treatment) were perfused for 1 hr with ACSF before applying HFS to the Schaffer commissural pathway in area CA₁ of the hippocampus. Theta burst stimulation (TBS) was used to elicit LTP and consisted of 10 HFS bursts (4 pulses at 100 Hz) repeated at 5 Hz [25]. During the experiments, responses were tested at 30-sec intervals for at least 10 min prior to TBS and again for at least 30 min after HFS. Two evoked responses were averaged 1 and 30 min after TBS to determine the possible effect of STZ treatment on short-term potentiation (STP) and LTP, respectively. As shown in Fig. 1B, STZ-treated rats exhibited the same increase in EPSP slope for STP as the controls ($79 \pm 20\%$ for STZ-treated vs $78 \pm 16\%$ for control rats; $n=7$, $p < 0.05$; t-test). However, and as reported previously, we observed that the induction of severe hyperglycemia as a result of STZ administration was followed by a significant loss of LTP in area CA₁ of hippocampal slices ($20 \pm 6\%$) when compared to control rats ($56 \pm 6.6\%$; $n=7$, $p < 0.05$; t-test) (see evoked responses in Fig. 1A).

LTD is the second major form of activity-dependent synaptic plasticity that can be generated by LFS of the Schaffer-commissural pathway in area CA₁ of the hippocampus. Like LTP, homosynaptic LTD in this hippocampal region appears to require NMDA receptor activation and changes in postsynaptic calcium concentration [1,2,44]. LFS, applied in the CA₁ of control animals, generated an initial decrease (45%) in the slope of field EPSP that rapidly recovered over a 5-min period to a magnitude of approximately 30% and remained stable afterward (Fig. 1D). In contrast to the deficit observed in LTP maintenance in STZ-treated rats, no differences were present in the degree of homosynaptic LTD between control and diabetic animals (Fig. 1C and 1D). Since both LTP and LTD are induced by NMDA receptor activation, we hypothesized that the selective loss of LTP maintenance in diabetic rats is not the result of disruption by STZ of NMDA receptor function.

To further test this possibility, we conducted a series of experiments in which we analyzed the NMDA-mediated components of synaptic responses evoked in a low-magnesium medium (50 μ M) containing 30 μ M of the AMPA receptor antagonist DNQX. NMDA-mediated components of synaptic transmission were generated at different stimulus intensities in area CA₁ of the hippocampus and the responses were expressed as mean slope of the evoked EPSPs. No reduction of the NMDA-mediated components was found between control and STZ-treated slices when stimulus intensity was varied between 100 and 600 μ A (Fig 2A). In contrast to the NMDA response, AMPA-mediated components of synaptic function measured in normal medium were found to be markedly reduced in STZ-treated slices when compared to control slices (Fig. 2B). Altogether, these data show that while NMDA receptor function is not modified by STZ treatment in area CA₁ of the hippocampus, a significant change in the synaptic response mediated by the AMPA subtype of glutamate receptors is associated with STZ administration. These results also support the idea that LTP impairment generated by STZ is probably due to selective alteration of AMPA receptors at the postsynaptic level [17].

Modulation of ³H-AMPA binding by calcium-dependent processes in STZ-treated rats

A selective increase in ³H-AMPA binding was reported previously in the hippocampus following LTP induction in rats [5,31,52], and it has been shown that treatment of rat brain sections with calcium is accompanied by a similar increase in ³H-AMPA binding in various hippocampal regions [53]. To test the possibility that the binding properties of AMPA receptors are differentially modulated in diabetic rats, we determined ³H-AMPA binding in control and STZ-treated rats after preincubation of brain sections with calcium. Adjacent brain sections were preincubated at 35°C in the presence or absence of 3.0 mM calcium-acetate and were then subjected to ³H-AMPA ligand binding autoradiography. Figure 3 presents typical autoradiograms obtained from both control and STZ-treated rats

with (C and D) and without (A and B) calcium preincubation. Fig. 3A and 3B represent sections from control and STZ-treated animals pre-incubated at 35°C in the absence of calcium. Visual examination of these autoradiographs clearly indicates that a decrease in ^3H -AMPA binding in various areas of the hippocampus is produced by STZ treatment. As reported previously [17], we found that STZ treatment elicited a significant decline of around 35% in ^3H -AMPA binding to CA₃ and CA₁ strata radiatum and oriens of the hippocampus. A similar fall (35-45%) was also observed in the dentate gyrus, striatum and cerebral cortex, while the molecular and granular layers of the cerebellum presented the smallest reduction of ^3H -AMPA binding (5%; data not shown). Visual examination of the autoradiographs also revealed that the calcium-induced increase in ^3H -AMPA binding (Fig. 3B and 3D) was reduced in the hippocampus with STZ treatment. Quantitative analysis confirmed the visual impression and indicated that STZ treatment resulted in a significant and uniform decrease in the capacity of calcium to up-regulate ^3H -AMPA binding in all the hippocampal regions analyzed in comparison to control rats. Statistical analysis revealed that the specific regions showing a significant decrease in response to calcium in diabetic rats included the strata radiatum and oriens of areas CA₁ and CA₃, and the molecular layer of the dentate gyrus (Fig. 3E). No significant difference in the capacity of calcium to increase ^3H -AMPA binding was found in the cerebellum and cortex, indicating that impaired modulation of AMPA receptors by calcium is specific to the hippocampus and not generalized throughout the brain.

To determine whether a reduced capacity of calcium-dependent PLA₂ to modulate ^3H -AMPA binding is associated with STZ treatment, synaptoneurosomes from control and diabetic rats were preincubated in the presence of 10 µg/ml PLA₂ or 10 µg/ml melittin, a potent activator of endogenous PLA₂. Similar to the calcium effect, stimulation of ^3H -AMPA binding by both exogenous PLA₂ and melittin was markedly reduced in hippocampal synaptoneurosomes prepared from STZ-treated rats (Fig. 4).

DISCUSSION

STZ-induced diabetes is a useful model for the investigation of numerous aspects of insulin-dependent diabetes mellitus. The present results confirm and extend the previously-reported observation that LTP in area CA₁ of hippocampal slices is severely impaired in STZ-treated rats [7]. In this study, we also demonstrated that this effect is selective for synaptic potentiation since LTD, the second major form of activity-dependent synaptic plasticity in the hippocampus, was not affected by STZ treatment. As both LTP and LTD induction in area CA₁ of the hippocampus were previously found to be generated postsynaptically by the activation of NMDA receptors [1], these results strongly suggest that STZ treatment does not decrease LTP expression only by reducing NMDA receptor function. Consistent with this idea are results showing that STZ treatment did not modify NMDA-mediated components of the synaptic response when evoked in a low-magnesium medium containing the AMPA receptor antagonist DNQX. Our experiments also revealed that STZ administration was associated with a selective reduction in physiological responses elicited by the AMPA subtype of glutamate receptors. Since a decrease in AMPA receptor affinity was found to be associated with STZ treatment [17], it is thus possible to suggest that a biochemical alteration of AMPA receptor properties might represent a critical step for regulating glutamatergic synapses. Interestingly, the present study also revealed that STZ administration markedly reduced the stimulation of ³H-AMPA binding elicited by either treatment of brain sections with calcium or activation of endogenous PLA₂ in rat synaptoneurosomes. This diminished capacity of calcium-dependent processes to modulate AMPA properties would provide a simple explanation for the LTP deficit observed during diabetes.

While NMDA receptor activation appears to be a crucial step in LTP induction [1,11,13], the location and nature of the mechanisms responsible for long-term maintenance of changes in synaptic efficacy remain subject to intense controversy. Several hypotheses

implicating both pre- and postsynaptic processes have been advanced to explain LTP expression [12,14,23,30,42,49,50]. Diabetes has been shown to affect neurotransmitter synthesis or release in several brain regions [7,9,24,38,57], and it can be argued that the impaired ability of STZ-treated rats to generate LTP in the hippocampus is related to alteration at the presynaptic level, which possibly involves a reduction of transmitter release at glutamatergic neurons. However, this interpretation is certainly not consistent with the present study as we found that STZ administration was associated with a selective decrease in physiological responses mediated by the AMPA subtype of glutamate receptors, without changes of synaptic responses mediated by NMDA receptors. If a decrease in transmitter release was to occur in area CA₁ of the hippocampus of diabetic rats, one would expect the synaptic responses mediated by both NMDA and AMPA receptors to change in the same direction. In addition, it is generally admitted that paired-pulse facilitation is a phenomenon due to presynaptic enhancement of transmitter release during a second pulse given 50-250 msec after the first stimulation [48,61]. Differences in the ratio of paired-pulse responses following LTP induction in the hippocampus have been used by several investigators to suggest that the expression of various forms of LTP differ in terms of presynaptic transmitter release mechanisms. Recently, Biessels et al. (1996) found that paired-pulse facilitation was not altered by STZ administration. This previous study and our present data certainly indicate that LTP impairment in diabetic rats is largely due to postsynaptic modifications rather than changes in presynaptic function. The present observation that diabetes is selectively affecting AMPA receptor function seems to be consistent with this interpretation.

Evidence for postsynaptic modifications during LTP has been provided on the basis of increased responsiveness to exogenous application of AMPA, and from experiments employing quantal analysis [12,15,29,30]. In particular, recent studies have shown that LTP expression may involve the uncovering of functional AMPA receptors that, prior to LTP

induction, were either not present in the postsynaptic membrane or were electrophysiologically silent [22,26]. This notion, which assumes the appearance of new functional AMPA receptors during LTP, is consistent with previous observations indicating that LTP formation in the rat hippocampus is associated with increased binding of ^3H -AMPA to glutamate/AMPA receptors [5,31,52]. Possible mechanisms by which synapses devoid of detectable AMPA receptors become responsive during LTP include the appearance of new functional receptors in the dendritic spine, uncovering of receptors already present in the membranes and changes in the affinity or biochemical properties of pre-existing receptors. We have presented evidence suggesting that PLA₂-induced modifications of AMPA receptor properties could be a necessary step for changes in synaptic operation during LTP. In particular, treatment of synaptic membranes with exogenous PLA₂ produced, similarly to LTP, a selective increase in the binding properties of AMPA receptors [32,34,36]. Furthermore, LTP was found to be absent in the early stages of brain development and after kainic acid-induced seizures in adult rats, two situations in which PLA₂ no longer increases ^3H -AMPA binding in synaptic membranes [3,36]. It is thus of interest that modulation of AMPA binding elicited by calcium and PLA₂ activation is also virtually absent in hippocampal preparations from diabetes-treated rats. Indeed, this reduced capacity of calcium-dependent phospholipases to modulate AMPA properties would provide a simple explanation for the observed LTP deficit during diabetes, inasmuch as a modification in binding properties by the enzymes would be reflected in a change in physiological responses mediated through AMPA receptors. It should be noted that LTP expression at the postsynaptic level may be associated with the activation of other calcium-dependent processes such as kinases [28] and proteases [56]. We cannot yet totally exclude a possible role of these enzymes in disturbances of the mechanism of LTP expression during diabetes.

The molecular mechanism responsible for the decreased ability of calcium-dependent PLA₂ to enhance AMPA receptor binding in STZ-treated rats remains unknown. Several possible interpretations could be proposed to explain these results. First, it has been demonstrated that STZ administration reduces ATP and phosphocreatine concentrations as well as the ATP/ADP ratio in rats [45]. As alterations in brain ATP concentrations are expected to modify the activity of various ATP-dependent protein kinases [37], and PLA₂ possesses phosphorylation sites [43,59], the marked decrease of ATP may be an important factor contributing to the reduced capacity of PLA₂ to up-regulate ³H-AMPA binding in diabetic rats. In this respect, treatment of synaptoneurosomes with protein kinase C (PKC) activators has been shown to increase both PLA₂ activity and the PLA₂-mediated augmentation of AMPA binding (Chabot et al., submitted). In this respect, it is tempting to suggest that alteration in PKC activity may be an important factor reducing PLA₂ action during diabetes. Alternatively, the phospholipid concentration of membranes was previously found to be affected by diabetes [27,39], and therefore PLA₂ treatment could produce very different disturbances in the lipid environment of AMPA receptors in control and STZ-treated rats. Finally, another possible explanation could be that STZ treatment differentially modifies the expression of various genes coding for AMPA receptors. In the brain, AMPA receptor subunits (GluR1-4) are coded by multiple genes, and it has been postulated that the AMPA receptor is a heteromeric molecule composed of a combinational arrangement of different subunits [21]. Here, we may assume that the significant impairment of AMPA receptor modulation by calcium and PLA₂ may reflect the differential expression of receptor subunits in various hippocampal structures of diabetic rats. Interestingly, previous work has shown that AMPA receptors devoid of the GluR1 subunit are not competent to express LTP in area CA₁ of the hippocampus [55], and we have recently found that STZ treatment is associated with a selective reduction of GluR1 immunoreactivity in the hippocampus [17]. In addition, other studies have shown that a selective decrease in GluR1 immunoreactivity may also be

reproduced by treatment of brain sections with calcium-dependent proteases [6], suggesting that changes in immunological properties are not necessarily due to differential expression of AMPA receptor subunits. Indeed, the elucidation of factors regulating GluR1 immunoreactivity could have possible important consequences for our understanding of the mechanisms underlying LTP deficits and impaired modulation of AMPA receptors in STZ-treated rats.

In conclusion, our results suggest that inappropriate regulation of AMPA receptor properties by calcium-dependent processes in STZ-treated rats could be responsible for the loss of LTP observed in diabetic animals. Understanding the biochemical factors participating in the impairment of AMPA receptor modulation might provide important clues revealing the very basis of both LTP and memory deficits in diabetes.

REFERENCES

1. Artola, A., Broecher, S. and Singer, W., Different voltage-dependent thresholds for inducing long-term depression and long-term potentiation in slices of rat visual cortex, *Nature*, 347 (1990) 69-72.
2. Artola, A. and Singer, W., Long-term depression of excitatory synaptic transmission and its relationship to long-term potentiation, *TINS*, 16 (1993) 480-487.
3. Baudry, M., Arst, D., Oliver, M. and Lynch, G., Development of glutamate binding sites and their regulation by calcium in rat hippocampus, *Brain Res.*, 227 (1981) 37-48.
4. Baudry, M. and Massicotte, G., Physiological and pharmacological relationships between long-term potentiation and mammalian memory, *Conc. Neurosci.*, 3 (1992) 79-98.
5. Bernard, J., Lahsaini, A. and Massicotte, G., Potassium-induced long-term potentiation in area Ca1 of the hippocampus involves phospholipase activation, *Hippocampus*, 4 (1994) 447-453.
6. Bi, X., Tocco, G., Baudry, M., Calpain-mediated regulation of AMPA receptors in adult rat brain, *Neuroreport*, 6 (1994), 61-64.
7. Biessels, G. J., Kamal, A., Ramakers, G. M., Urban, I. J., Spruijt, B. M., Erkelens, D. W. and Gispen, W. H., Place learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-induced diabetic rats, *Diabetes*, 45 (1996) 1259-1266.

8. Bitar, M., Koulu, M., Rapoport, S. I. and Linnoila, M., Diabetes-induced alteration in brain monoamine metabolism in rats, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 236 (1985) 432-437.
9. Chabot, C., Bernard, J., Normandin, M., Ohayon, M., Baudry, M. and Massicotte, G., Developmental changes in depolarization-mediated AMPA receptor modifications and potassium-induced long-term potentiation, *Dev. Brain Res.*, 93 (1996) 70-75.
10. Chu, P. C., Lin, M. T., Shian, L. R. and Leu, S. Y., Alterations in physiologic functions and in brain monoamine content in streptozotocin-diabetic rats, *Diabetes*, 35 (1986) 481-484.
11. Collingridge, G. L., Kehl, S. J. and McLennan, H., Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus, *J. Physiol. Lond.*, 334 (1983) 33-46.
12. Davies, S. N., Lester, R. A., Reymann, K. G. and Collingridge, G. L., Temporally distinct pre- and post-synaptic mechanisms maintain long-term potentiation, *Nature*, 338 (1989) 500-503.
13. Dudek, S. M. and Bear, M. F., Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade, *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, 89 (1992) 4363-4367.
14. Foster, T. C., Gagné, J. and Massicotte, G., Mechanism of altered synaptic strength due to experience: relation to long-term potentiation, *Brain Res.*, 736 (1996) 243-250.

15. Foster, T. C. and McNaughton, B. L., Long-term enhancement of CA1 synaptic transmission is due to increased quantal size, not quantal content, *Hippocampus* , 1 (1991) 79-91.
16. Franceschi, M., Cecchetto, R., Minicucci, F., Smizne, S., Baio, G. and Canal, N., Cognitive processes in insulin-dependent diabetes, *Diabetes Care* , 7 (1984) 228-231.
17. Gagné, J., Milot, M., Gélinas, S., Lahsaïni, A., Trudeau, F., G., M. M. and Massicotte, G., Binding properties of glutamate receptors in streptozotocin-induced diabetes in rats, *Diabetes*, 46 (1997) 841-846.
18. Haley, J. E., Wilcox, G. L. and Chapman, P. F., The role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation, *Neuron*, 8 (1992) 211-216.
19. Helkala, E. L., Niskanen, L., Viinamaki, H., Partanen, J. and Uusitupa, M., Short-term and long-term memory in elderly patients with NIDDM, *Diabetes Care*, 18 (1995) 681-685.
20. Hollingsworth, E. B., McNeal, E. T., Burton, J. L., Williams, R. J., Daly, J. W. and Creveling, C. R., Biochemical characterization of a filtered synaptoneurosome preparation from guinea-pig cerebral cortex: cyclic adenosine 3',5'-monophosphate generating systems, receptors, and enzymes, *J. Neurosci.*, 5 (1985) 2240-2253.
21. Hollman, M. and Heinemann, S., Cloned glutamate receptors, *Ann. Rev. Neurosci.*, 17 (1994) 31-108.

22. Isaac, J. T. R., Nicoll, R. A. and Malenka, R. C., Evidence for silent synapses: Implications for the expression of LTP, *Neuron*, 15 (1995) 427-434.
23. Kauer, J. A., Malenka, R. C. and Nicoll, R. A. A persistent postsynaptic modification mediates long-term potentiation in the hippocampus, *Neuron*, 1 (1988) 911-917.
24. Lackovic, Z., Salkovic, M., Kuci, S. and Relja, M., Effect of long-lasting diabetes mellitus on rat and human brain monoamines, *J. Neurochem.*, 54 (1990) 143-147.
25. Larson, J. and Lynch, G., Role of N-Methyl-D-Aspartate receptors in the induction of synaptic potentiation by burst stimulation patterned after the hippocampal theta rhythm, *Brain Res.*, 441 (1988) 111-118.
26. Liao, D., Hessler, N. A. and Malinow, R., Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice, *Nature*, 375 (1995) 400-404.
27. Makar, T. K., Hungund, B. L., Cook, G. A., Kashfi, K. and Cooper, A. J. L., Lipid metabolism and membrane composition are altered in the brains of type II diabetic mice, *J. Neurochem.*, 64 (1995) 2159-2168.
28. Malenka, R. C., Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD, *Cell*, 78 (1994) 535-538.
29. Malinow, R. and Tsien, R. W., Presynaptic changes revealed by whole-cell recordings of long-term potentiation in rat hippocampal slices, *Nature*, 346 (1990) 177-180.

30. Manabe, T., Renner, P. and Nicoll, R. A., Postsynaptic contribution to long-term potentiation revealed by the analysis of miniature synaptic currents, *Science*, 355 (1992) 50-55.
31. Maren, S., Tocco, G., Standley, S., Baudry, M. and Thompson, R. F., Postsynaptic factors in the expression of long-term potentiation (LTP): increased glutamate receptor binding following LTP induction in vivo, *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, 90 (1993) 9654-9658.
32. Massicotte, G. and Baudry, M., Modulation of AMPA/Quisqualate receptors by phospholipase A2 treatment, *Neurosci. Lett.*, 118 (1990) 245-248.
33. Massicotte, G. and Baudry, M., Triggers and substrates of hippocampal synaptic plasticity, *Neuro. Biobehav. Rev.*, 15 (1991) 415-423.
34. Massicotte, G., Bernard, J. and Baudry, M., Postnatal changes in AMPA receptor regulation by phospholipase A2 treatment of synaptic membranes: Temporally differential affects on agonist and antagonist binding, *Dev. Brain Res.*, 66 (1992) 203-208.
35. Massicotte, G., Oliver, M. W., Lynch, G. and Baudry, M., Effect of bromophenacylbromide, a Phospholipase A2 inhibitor, on the induction and maintenance of LTP in hippocampal slices, *Brain Res.*, 537 (1990) 49-53.
36. Massicotte, G., Vanderklish, P., Lynch, G. and Baudry, M., Modulation of AMPA/Quisqualate receptors by Phospholipase A2: a necessary step in long-term potentiation, *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, 88 (1991) 1893-1897.

37. McLean, W. G., Pekiner, C., Cullum, N. A. and Casson, I. F., Posttranslational modifications of nerve cytoskeletal proteins in experimental diabetes, *Mol. Neurobiol.*, 6 (1992) 225-237.
38. Mooradian, A. D., Blood-brain barrier choline transport is reduced in diabetic rats, *Diabetes*, 36 (1987) 1094-1097.
39. Mooradian, A. D., Dickerson, F. and Smith, T. L., Lipid order and composition of synaptic membranes in experimental diabetes mellitus, *Neurochem. Res.*, 15 (1990) 981-985.
40. Morris, R. G. M., Anderson, E., Lynch, G. S. and Baudry, M., Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by the N-Methyl-D-Aspartate receptor antagonist, AP-5, *Nature*, 319 (1986) 774-776.
41. Morris, R. G. M., Davis, S. and Butcher, S. P., Hippocampal synaptic plasticity and NMDA receptors: a role in information storage, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 329 (1990) 187-204.
42. Muller, D., Joly, M. and Lynch, G., Contributions of quisqualate and NMDA receptors to the induction and expression of LTP, *Science*, 242 (1988) 1694-1697.
43. Nakazawa, K., Mikawa, S., Hashikawa, T. and Ito, M., Transient and persistent phosphorylation of AMPA-type glutamate receptor subunits in cerebellar purkinje cells, *Neuron*, 15 (1995) 697-709.

44. Neveu, D. and Zucker, R. S., Postsynaptic levels of calcium needed to trigger LTD and LTP, *Neuron*, 16 (1996) 619-629.
45. Nitsch, R. and Hoyer, S., Local action of the diabetogenic drug, streptozotocin, on glucose and energy metabolism in rat brain cortex, *Neurosci. Lett.*, 128 (1991) 199-202.
46. Oliver, M. W., Baudry, M. and Lynch, G., The protease inhibitor leupeptin interferes with the development of LTP in hippocampal slices, *Brain Res.*, 505 (1989) 233-238.
47. Reaven, G. M., Thompson, L. W., Nahum, D. and Haskins, E., Relationship between hyperglycemia and cognitive function in older NIDDM patients, *Diabetes Care*, 13 (1990) 16-21.
48. Schulz, P. E., Cook, E. P. and Johnston, D., Changes in paired-pulse facilitation suggest presynaptic involvement in long-term potentiation, *J. Neurosci.*, 14 (1994) 5325-5337.
49. Shahi, K. and Baudry, M., Increasing binding affinity of agonists to glutamate receptors increases synaptic responses at glutamatergic synapses, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 89 (1992) 6881-6885.
50. Staubli, U., Kessler, M. and Lynch, G., Aniracetam has proportionately smaller effects on synapses expressing long-term potentiation: evidence that receptor changes subserve LTP, *Psychobiol.*, 18 (1990) 377-381.

51. Staubli, U., Thibault, O., DiLorenzo, M. and Lynch, G., Antagonism of NMDA receptors impairs acquisition but not retention of olfactory memory, *Beh. Neurosci.*, 103 (1989) 54-60.
52. Tocco, G., Maren, S., Shors, T., Baudry, M. and Thompson, R. F., Long-term potentiation is associated with increased 3H-AMPA binding in rat hippocampus, *Brain Res.*, 573 (1992) 228-234.
53. Tocco, G., Massicotte, G., Standley, S., Thompson, R. F. and Baudry, M. Effect of temperature and calcium on the binding properties of the AMPA receptor in frozen rat brain sections, *Eur. J. Neurosci.*, 4 (1992) 1093-1103.
54. Tun, P. A., Nathan, D. M. and Perimuter, L. C., Cognitive and affective disorders in elderly diabetics, *Clin. Geriatr. Med.*, 6 (1990) 731-746.
55. Vanderklish, P., Neve, R., Bahr, B. A., Arai, A., Hennegriff, M., Larson, J. and Lynch, G., Translational suppression of a glutamate receptor subunit impairs long-term potentiation, *Synapse.*, 12 (1992) 333-337.
56. Vanderklish, P., Saido, T. C., Gall, C., Arai, A. and Lynch, G. Proteolysis of spectrin by calpain accompanies theta-burst stimulation in cultured hippocampal slices, *Mol. Brain Res.*, 31 (1995) 25-35.
57. Welsh, B. and Wecker, L., Effects of streptozotocin-induced diabetes on acetylcholine metabolism in rat brain, *Neurochem. Res.*, 16 (1991) 453-460.

58. Williams, J. H., Errington, M. L., Lynch, M. A. and Bliss, T. V., Arachidonic acid induces a long-term activity-dependent enhancement of synaptic transmission in the hippocampus, *Nature*, 341 (1989) 739-742.
59. Yakel, J. L., Vissavajhala, P., Derkach, V. A., Brickey, D. A. and Soderling, T. R., Identification of a Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II regulatory phosphorylation site in non-N-methyl-D-aspartate glutamate receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 92 (1995) 1376-1380.
60. Zalutsky, R. A. and Nicoll, R. A., Comparison of two forms of long-term potentiation in single hippocampal neurons, *Science*, 248 (1990) 1619-1624.
61. Zucker, R. S., Short-term synaptic plasticity, *Ann. Rev. Neurosci.*, 12 (1989) 13-22.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Effect of STZ treatment on LTP and LTD in area CA₁ of the hippocampus.

Field EPSPs were recorded in the stratum radiatum of CA₁ pyramidal cells in hippocampal control and STZ-treated slices. (A) Sample EPSPs from control and STZ slices taken before (1) and 30 min after (2) TBS (10 trains of 4 100-Hz pulses given at 5 Hz). (B) The slope of the response exhibited approximately 75% potentiation in both, control (open squares) and STZ (closed circles) slices following TBS which slowly decayed during the first 10 min. In control slices, the potentiation remained stable with a 55% increase. In STZ-treated slices, note the progressive decay in the magnitude of potentiation resulting in a small 20% increase following TBS. (C) Sample EPSPs from control and STZ-treated slices taken before (1) and 30 min after (2) LFS (5 Hz for 5 min). (D) The slope of the response exhibited approximately 45% depression in both, control (open squares) and STZ-treated (closed circles) slices following LFS which slowly decayed during the first 5 min to a magnitude of 30%. The values obtained during the period preceding TBS and LFS were averaged to derive baseline values. Each point represents the mean $\pm$ S.E.M. of 8 different experiments in which the responses of control and STZ-treated slices were measured before and after TBS and LFS.

Figure 2: Effect of STZ treatment on NMDA- and AMPA-mediated components of synaptic responses in area CA₁ of the hippocampus.

Synaptic transmission were evoked in both control (open squares) and STZ-treated (closed circles) slices in the presence of 50 μ M magnesium and 30 μ M DNQX for NMDA-mediated responses (A) or in the presence of ACSF medium only for AMPA-mediated responses (B). Note that STZ administration did not reduce NMDA-mediated components of synaptic transmission while the same treatment severely reduced AMPA-mediated responses

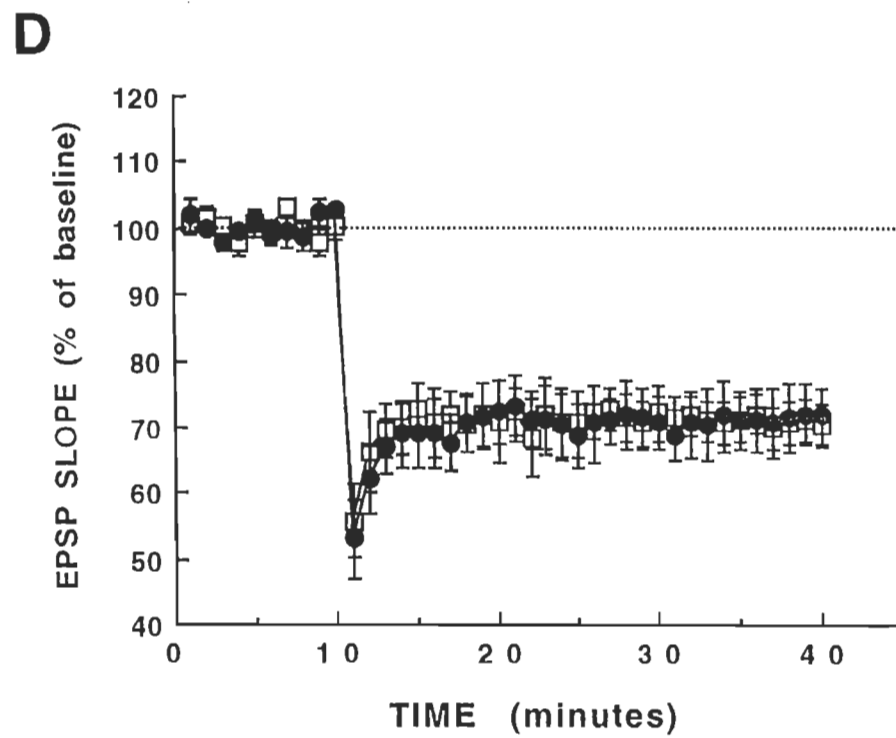
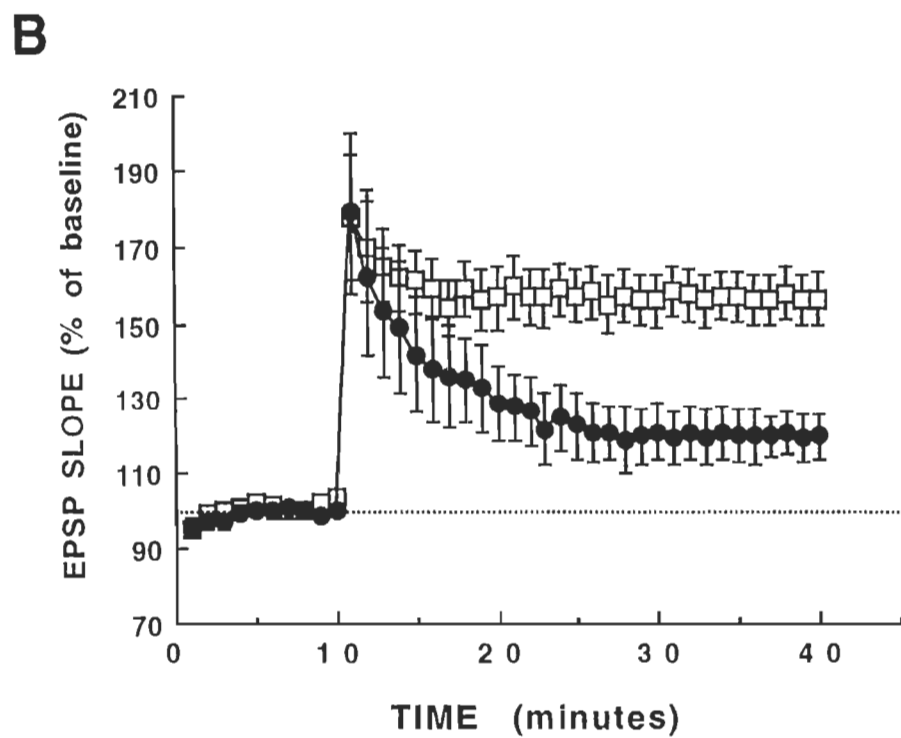
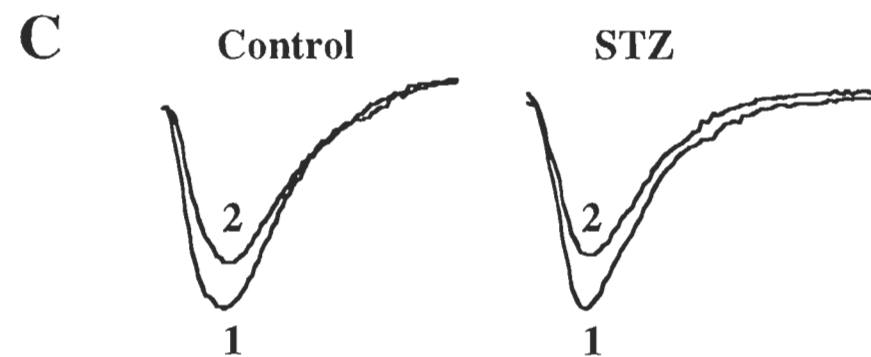
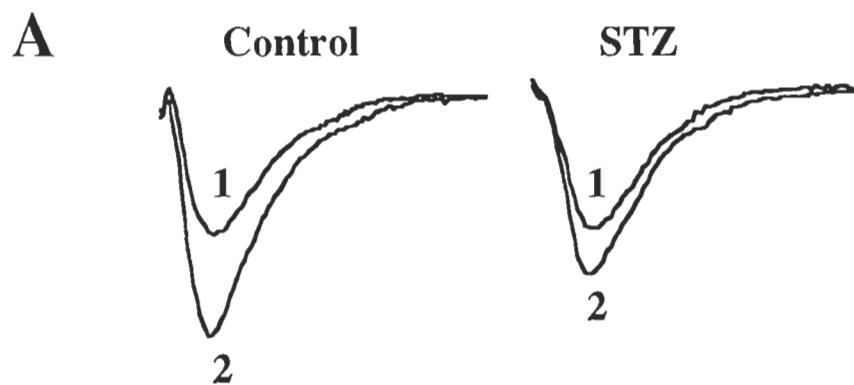
when compared with control slices. The results were expressed as the mean slope recorded during field EPSPs and are means $\pm$ S.E.M. of 8 different experiments.

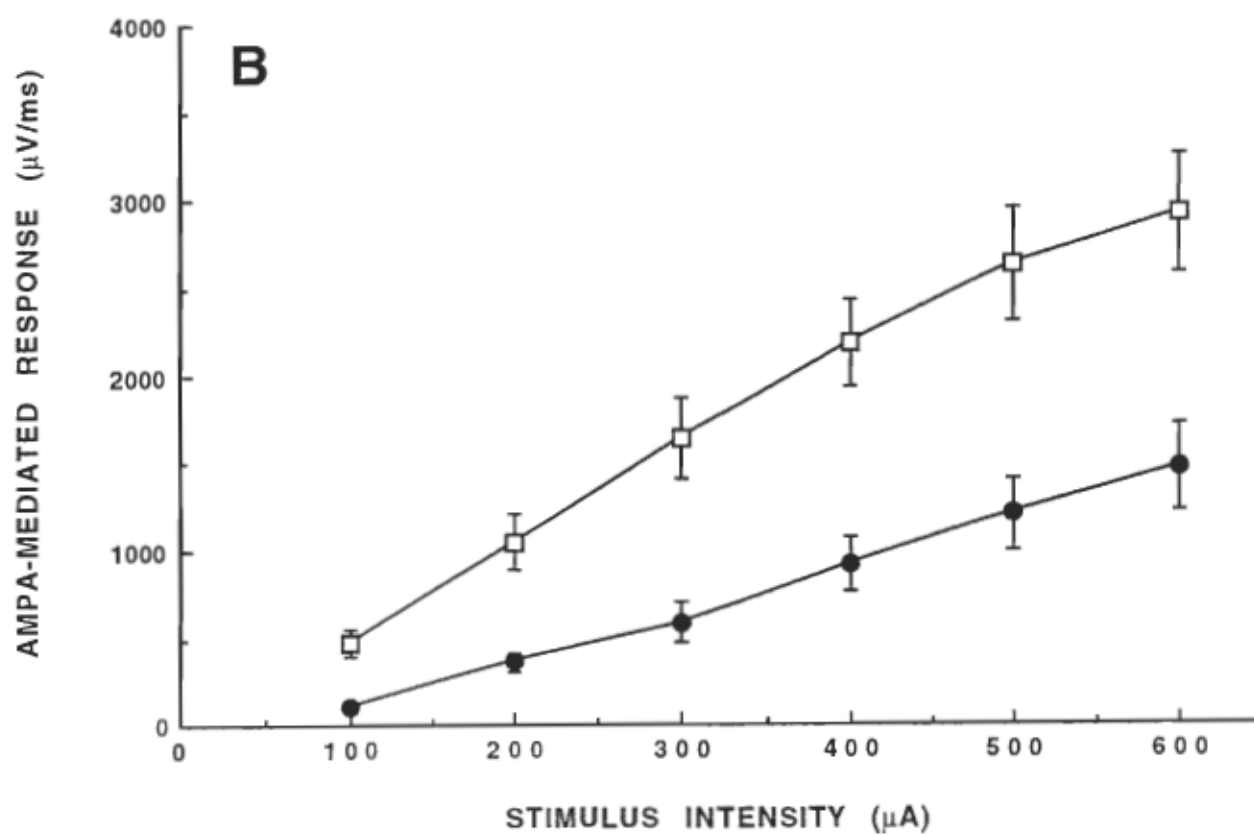
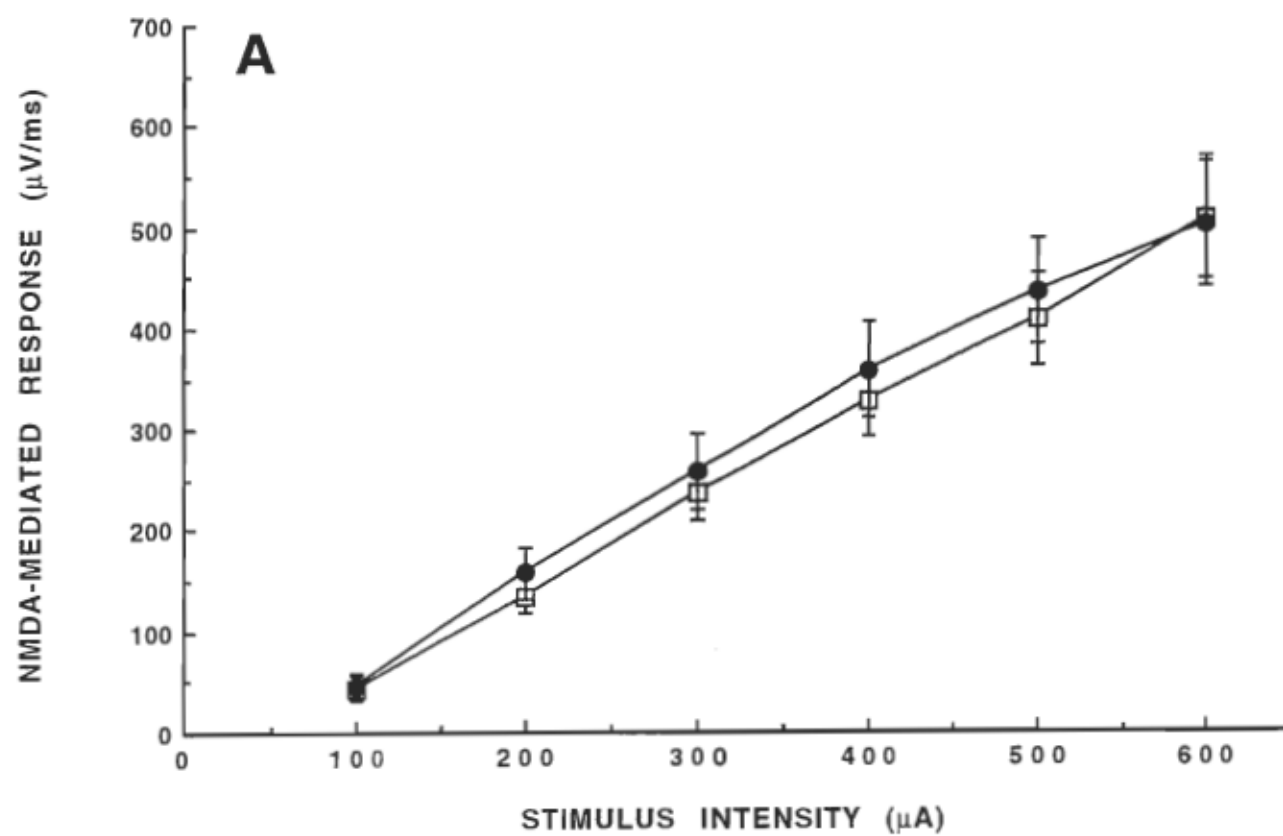
Figure 3: Effect of STZ treatment on the calcium-induced increase in ^3H -AMPA binding in the hippocampus from rat brain sections.

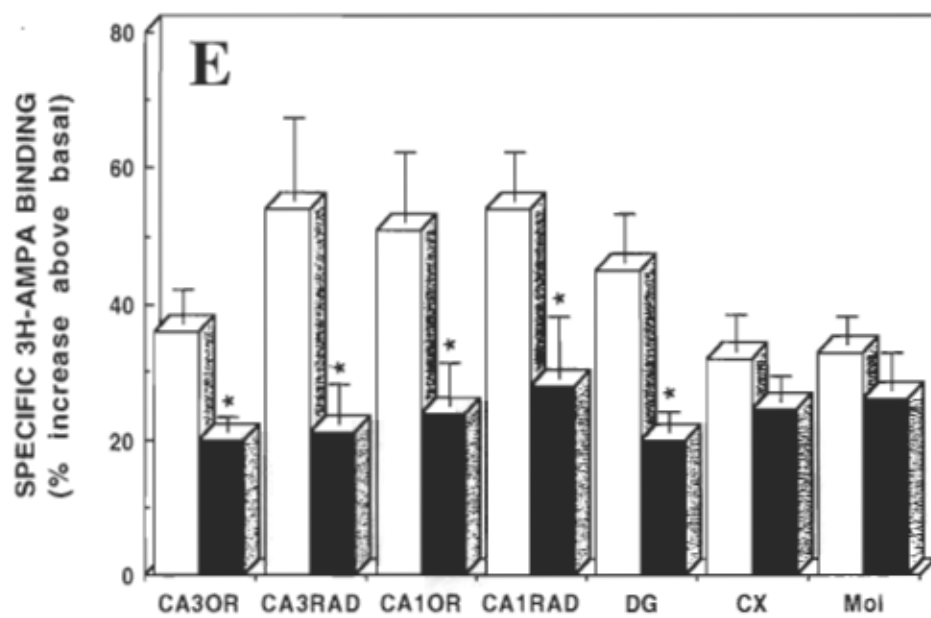
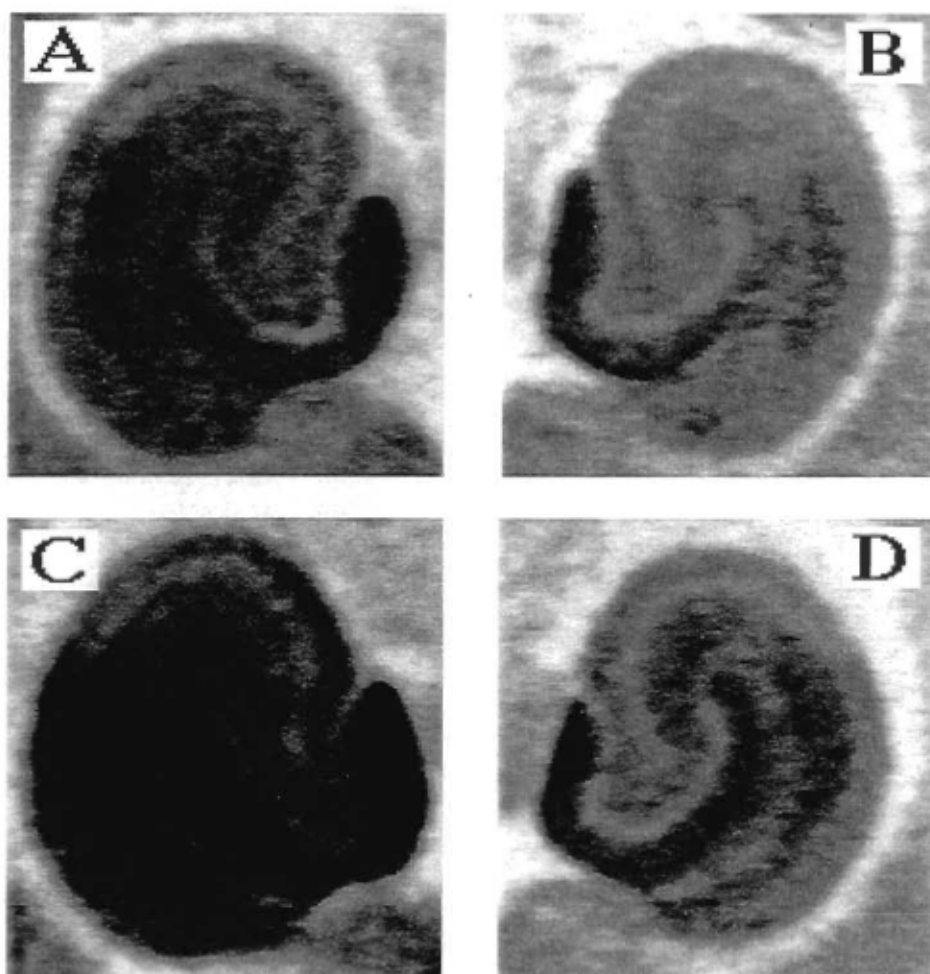
Adjacent horizontal sections were preincubated at 35°C for 1 h in Tris-acetate buffer (100 mM, pH 7.4, containing 100 μM EGTA) without (A and B) or with (C and D) 3 mM calcium. They were then washed in buffer alone and processed for ^3H -AMPA binding as described in Materials and Methods. Visual examination of autoradiographs clearly indicates that the increase in ^3H -AMPA binding elicited by calcium is decreased in STZ (D) sections when compared with control (C) sections. (E) All autoradiographs shown in Figure 3 were analyzed with an analysis system for various hippocampus regions, the cortex and molecular layer of the cerebellum. The results represent calcium-induced stimulation of ^3H -AMPA binding (expressed as percentage increases over basal binding) in both, control (open bars) and STZ-treated sections (closed bars). The results are means $\pm$ S.E.M. of at least 8 different measurements per rat with 5 different rats. ($F(7,69) = 4.69$; $P < 0.01$). * $P < 0.05$ versus control, Scheffe's test.

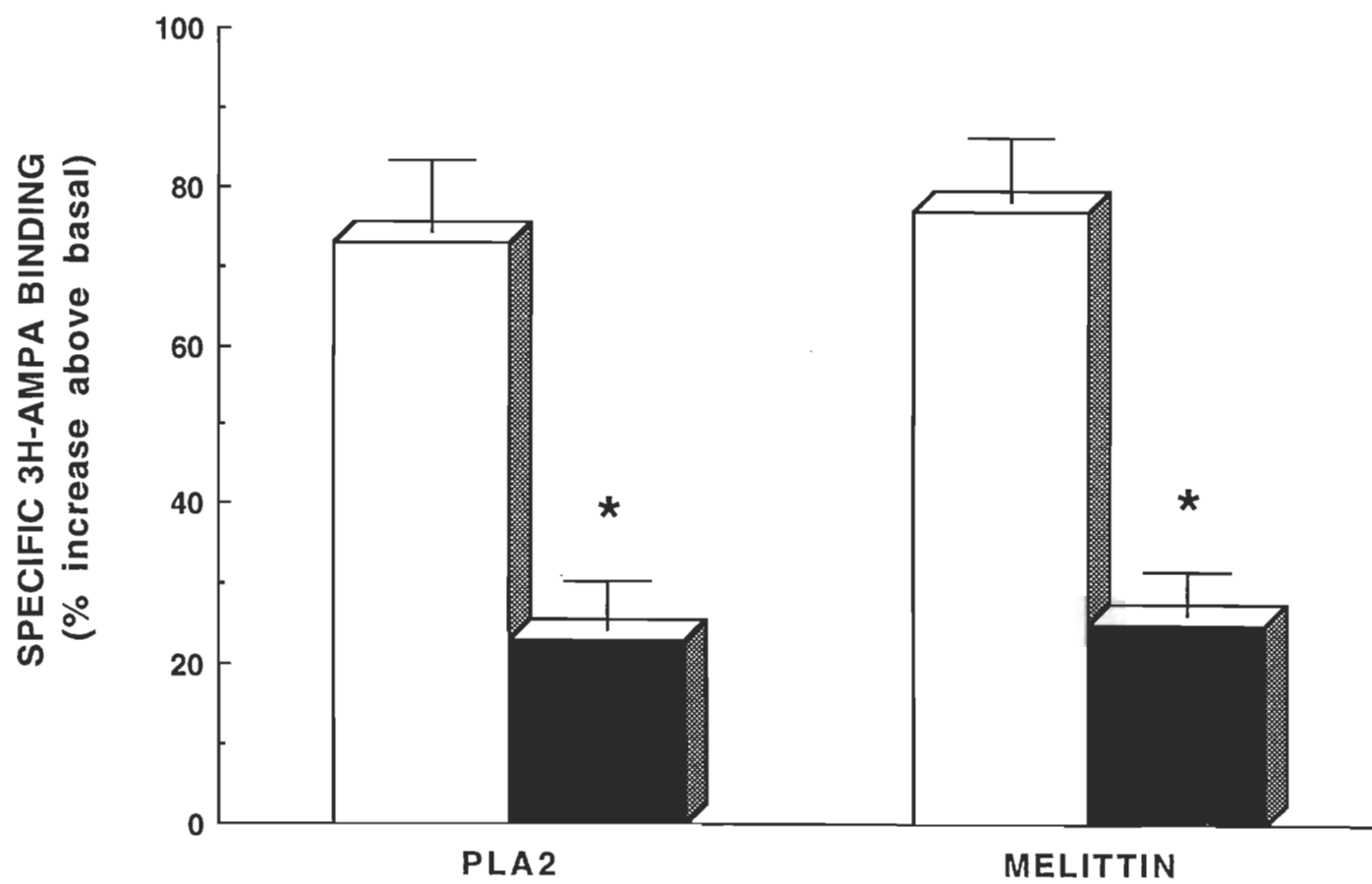
Figure 4: Effect of STZ treatment on the PLA_2 - and melittin-induced increase in ^3H -AMPA binding in synaptoneurosomes from the rat hippocampus.

Hippocampal preparations were incubated for 30 min at 30°C with PLA_2 or melittin in control (open bars) and STZ-treated (closed bars) synaptoneurosomes. The results represent melittin- and PLA_2 -induced stimulation of ^3H -AMPA binding (expressed as percentage increases over basal binding) in both, control (open bars) and STZ-treated (closed bars) synaptoneurosomes. The results are means $\pm$ S.E.M. of 6 experiments. Asterisks refer to comparisons with control rats (* $P < 0.05$; Student's t test).









CHAPITRE 4

Discussion et conclusion **générales**

DISCUSSION

L'ensemble des informations recueillies dans le cadre de cette thèse révèle que des perturbations dans les propriétés biochimiques des récepteurs glutamatergiques de type AMPA sont générées lors de l'enrichissement cognitif et au cours du diabète chez le rat, deux situations connues pour affecter les fonctions cognitives des animaux de laboratoire. Nos études électrophysiologiques confirment que les altérations biochimiques des récepteurs AMPA pour le glutamate se répercutent par une perte de LTP dans la région CA₁ de l'hippocampe et permettent de mettre en évidence le rôle crucial que peut jouer la modulation biochimique de ce type de récepteur au glutamate dans les processus de mémorisation. Nous tenterons ici de mettre en lumière les mécanismes moléculaires susceptibles de contribuer aux changements biochimiques et fonctionnels des récepteurs au glutamate chez les animaux enrichis cognitivement et atteints de diabète mellitus.

Bases biochimiques de l'enrichissement cognitif

Plusieurs études ont démontré, dans le passé, l'existence de modifications dans l'expression de certains gènes chez l'animal de laboratoire ayant été soumis à un environnement dit complexe (Torasdotter et coll., 1996; Olson et coll., 1994). L'environnement complexe est en fait le résultat d'un hébergement où l'animal se voit confronté à des stimulations visuelles et motrices constantes. Dans de telles conditions, l'animal enrichi voit ses performances cognitives accentuées et on note, par exemple, une amélioration substantielle de la capacité de ces animaux à effectuer certains apprentissages,

en particulier pour ceux nécessitant une reconnaissance de l'environnement visuo-spatial (Moser et coll., 1994). Ce genre d'apprentissage est reconnu pour dépendre de la fonction hippocampale et semble, pour plusieurs neurobiologistes, nécessiter la production endogène de LTP dans la région hippocampale (Moser et coll., 1994; Morris et coll., 1992).

Notre étude a permis d'établir que l'enrichissement cognitif est associé à la production dans l'hippocampe d'une forme de LTP endogène qui s'apparente grandement à la plasticité synaptique observée normalement dans des conditions *in vitro*. Par exemple, nos résultats montrent bien que la réponse synaptique assurée par les récepteurs de type AMPA est accentuée dans le Gyrus Dentatus (GD) des animaux enrichis. D'un point de vue biochimique, les expériences d'autoradiographie quantitative démontrent que cette augmentation de l'efficacité des neurones glutamatergiques au cours de l'enrichissement cognitif est associée à une hausse de la liaison de l'agoniste ^3H -AMPA dans les différentes régions de l'hippocampe. Cependant, on ne note aucune modification de la liaison de l'antagoniste spécifique du récepteur AMPA, le ^3H -CNQX, dans les diverses structures de l'hippocampe lors de cette condition d'enrichissement cognitif. Cette modification sélective des récepteurs AMPA pour son agoniste radioactif suggère fortement que l'augmentation de liaison du ^3H -AMPA chez les animaux enrichis n'est pas consécutive à une hausse du nombre d'unités réceptrices, mais plutôt à un accroissement de l'affinité du récepteur. Ces résultats sont bien sûr à corréler avec ceux obtenus dans les expériences *in vitro*, lesquels ont démontré que la LTP électrique et celle induite par dépolarisation chimique sont aussi

liées à des changements spécifiques de la liaison du ^3H -AMPA à son récepteur (Bernard et coll., 1994; Tocco et coll., 1992b).

Bien sûr dans le cadre de cette étude, nous ne pouvons établir un lien direct entre les capacités d'un animal enrichi à effectuer certaines tâches d'apprentissage et les modifications biochimiques et/ou électrophysiologiques observées dans l'hippocampe de ces animaux. Pour plusieurs, la LTP constitue fort probablement le mécanisme par excellence du stockage de l'information dans le cerveau (Lynch, 1998; Hölscher, 1997). Par ailleurs, il est convenu qu'une saturation du niveau de LTP dans l'hippocampe devrait conduire à une perte d'efficacité au niveau mnésique. Les données actuelles, obtenues chez les rats enrichis, vont toutefois à l'encontre de cette hypothèse. En effet, il fut constaté que l'enrichissement cognitif génère une LTP endogène dans l'hippocampe et ce, en dépit du fait que ces animaux sont connus pour effectuer avec plus de facilité les tâches d'ordre visuo-spatiales (Moser et coll., 1993). Il nous apparaît donc raisonnable de suggérer que la LTP puisse être un processus facilitateur de la communication neuronale dont l'ensemble des régions du cerveau prendraient avantage lors des processus de mémorisation. Une hypothèse qui semble de plus en plus rallier les neurobiologistes (Hölscher, 1997; Martinez et Derrick, 1996).

Comme nous l'avons déjà mentionné, le maintien de la LTP pourrait lui-même résulter d'un changement à long terme de la capacité des neurones à libérer leur neurotransmetteur glutamate. Une augmentation du niveau de relâche en neurotransmetteur glutamate pourrait générer la hausse de communication neuronale entre les neurones de l'hippocampe et on ne peut donc exclure, pour le moment, la possibilité qu'une modification

présynaptique puisse contribuer aux altérations fonctionnelles des neurones glutamatergiques lors de l'enrichissement cognitif. Cependant, nos expériences électrophysiologiques révèlent que le niveau de facilitation pairée (double stimulation électrique rapprochée) demeure inchangé chez les animaux soumis à une période d'enrichissement cognitif. La facilitation pairée, c'est connu, est un processus électrophysiologique saturable qui permet d'évaluer les fonctions de nature purement présynaptique (Staubli et coll., 1990; Zalutsky et Nicoll., 1990). Or, le fait qu'elle ne soit pas affectée par l'enrichissement cognitif laisse présager que le niveau de relâche en glutamate par la portion présynaptique n'est pas modifié par cette condition particulière d'hébergement.

Plusieurs études ont clairement démontré que les conditions de stress peuvent grandement interférer avec les mécanismes physiologiques de l'apprentissage et de la mémorisation (Shors et Dryver, 1992; Shors et Thompson, 1992; Shors et coll., 1989; Foy et coll., 1987). Par exemple, ces études ont démontré que l'application d'un stress intense chez l'animal de laboratoire peut générer des troubles marqués dans la mémorisation de certaines tâches et entraîne, par le fait même, une perte importante de la capacité des neurones de l'hippocampe à produire la LTP. Ce déficit en LTP lors du stress résulterait vraisemblablement de la production importante de glucocorticoïdes par les glandes surrénales en situation de stress (Kerr et coll., 1994; Pavlides et coll., 1993; Shors et coll., 1990). On note, par ailleurs, chez les animaux stressés, une hausse substantielle de liaison

de l'AMPA tritié dans les différentes régions de l'hippocampe, un effet qui s'apparente grandement à celui observé chez les animaux enrichis (Tocco et coll., 1991).

Il est donc probable que les perturbations physiologiques des récepteurs au glutamate observées dans l'enrichissement cognitif puissent être la conséquence d'un stress chronique lié à la nature même d'un hébergement dit enrichi. Dans ce cas, nous devons assumer que les effets du stress et de l'enrichissement cognitif convergent vers un mécanisme cellulaire commun, qui pourrait essentiellement se répercuter au niveau des caractéristiques de liaison du récepteur AMPA. Il est toutefois important de souligner que, d'un point de vue comportemental, l'état de stress se caractérise par des problèmes graves d'apprentissage, alors que l'enrichissement cognitif se caractérise, quant à lui, par une amélioration importante des fonctions de mémorisation. Il apparaît donc peu probable que les changements biochimiques et électrophysiologiques observés chez l'animal enrichi ne soient que le résultat d'un stress chronique, compte tenu des conséquences diamétralement opposées de ces manipulations sur le comportement cognitif des animaux.

Les mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de la modulation des récepteurs AMPA au cours de l'enrichissement cognitif restent évidemment à préciser. Dans l'introduction, nous avons discuté de l'importance que joue le calcium dans le développement du phénomène de la LTP. Il fut démontré que le traitement de coupes minces de cerveaux par ce cation provoque une augmentation importante de la liaison du ³H-AMPA dans la région hippocampale (Tocco et coll., 1992a). Selon plusieurs neurobiologistes, cet ion assurerait, par l'intermédiaire de processus enzymatiques situés

dans les compartiments postsynaptiques des neurones, la modulation des récepteurs AMPA dans le maintien de la LTP (Kullmann, 1994; Manabe et Nicoll, 1994; Ambros-Ingerson et coll., 1993; Baudry et Massicotte, 1992; Massicotte et Baudry, 1991). Pour Massicotte et ses collaborateurs, ce serait l'activation des enzymes reconnues pour affecter l'environnement lipidique des membranes neuronales qui induirait cette hausse de liaison au récepteur AMPA (Chabot et coll., 1998; Bernard et coll., 1995; Bernard et coll., 1994; Massicotte et coll., 1991; Massicotte et Baudry, 1990). À cet égard, il a été démontré que la phosphatidylsérine (PS) induit, tout comme dans l'enrichissement cognitif, une hausse importante de la liaison du ^3H -AMPA dans la structure hippocampale (Gagné et coll., 1996; Baudry et coll., 1991). De plus, les résultats obtenus dans le cadre de la présente étude laissent entrevoir que les changements induits par l'enrichissement cognitif seraient le résultat d'une altération des structures lipidiques, compte tenu du fait que la capacité du calcium et de la PS à modifier le récepteur AMPA est substantiellement réduite chez les rats préalablement enrichis.

On ne peut toutefois exclure la possibilité que l'action de l'enrichissement cognitif puisse entraîner une modification de la composition même du complexe récepteur AMPA. Tel que vu précédemment, des études de biologie moléculaire ont démontré l'existence d'au moins 4-ARN messagers codant pour la famille des récepteurs AMPA, lesquels sont capables de produire par épissage alternatif deux versions étroitement apparentées d'une même protéine. Les deux versions, nommées "flip" et "flop", possèdent des caractéristiques électrophysiologiques distinctes, flip étant beaucoup susceptible de générer un influx ionique

membranaire que flop. Ainsi, il est concevable que l'expression de ces deux versions de récepteurs AMPA puisse être régulée de façon différentielle suite à l'enrichissement cognitif chez le rat, et ce, en faveur d'une plus grande production de la version flip. Dans ce cas, la perte de modulation des récepteurs AMPA par le calcium et la PS pourraient, en fait, refléter un changement d'expression des différentes sous-unités des récepteurs AMPA chez les animaux conditionnés. Toutefois, notre analyse par les techniques de transfert de type Western et par hybridation *in situ* ne révéla aucun changement du niveau d'expression des différentes sous-unités du récepteur AMPA dans l'hippocampe des animaux enrichis, suggérant que les changements du niveau de liaison et de régulation du récepteur AMPA chez les animaux enrichis résultent possiblement de modifications à caractère post-traductionnel.

Le diabète mellitus comme modèle d'étude des mécanismes biochimiques de la mémorisation

Les évidences présentées lors de nos travaux sur l'enrichissement cognitif supportent l'idée qu'une modification spécifique des caractéristiques de liaison des récepteurs AMPA soit essentielle pour la mise en place des mécanismes physiologiques de la mémorisation. Or, comme nous l'avons mentionné précédemment, il est possible que l'effet rapporté dans cette condition ne soit que le résultat d'un stress chronique chez l'animal enrichi et, par conséquent, il est possible que la hausse de liaison notée au niveau du récepteur AMPA lors de l'enrichissement cognitif puisse n'être aucunement reliée aux processus biochimiques de la mémorisation. Afin de supporter notre hypothèse voulant que la régulation des récepteurs

AMPA contribue à la mise en place des processus cognitifs, nous avons évalué l'effet du diabète mellitus, et ce, tant sur les propriétés biochimiques des récepteurs au glutamate que sur les caractéristiques électrophysiologiques de ces mêmes récepteurs dans la région CA₁ des tranches d'hippocampe. L'utilisation de ce modèle animal reposait essentiellement sur les nombreuses évidences de la littérature démontrant que le diabète mellitus est associé à des troubles de mémoire chez l'humain et l'animal de laboratoire (Flood et coll., 1990; Mooradian et coll., 1988; Ryan et coll., 1985). Par ailleurs, dans ce même modèle de diabète, un déficit important dans la capacité de l'hippocampe à générer la LTP fut rapporté en 1996 par Biessels et ses collègues. Par conséquent, nous avons pris avantage de cette condition pour étudier si le déficit électrophysiologique en LTP observé chez les rats diabétiques résulte d'une perturbation dans les mécanismes de régulation des récepteurs AMPA.

Une première série d'expériences a permis de mettre en évidence que les propriétés biochimiques de base des récepteurs AMPA sont affectées chez les rats traités à la streptozotocin (STZ), une drogue reconnue pour détruire les îlots β de Langerhans du pancréas, sécréteurs de l'insuline. Nos résultats démontrent clairement, par ailleurs, qu'une diminution de l'affinité des récepteurs AMPA est observée après le développement du diabète mellitus chez le rat. Les principales régions touchées par l'administration de STZ sont le striatum, le cortex cérébral et l'hippocampe, alors que les autres structures du cerveau ne semblent pas affectées par ce même traitement. Fait intéressant, cette baisse du niveau de liaison aux récepteurs AMPA semble spécifique pour ces derniers puisque la

liaison mesurée aux sites NMDA n'est pas touchée par l'administration de STZ; cette observation n'est sûrement pas sans intérêt puisqu'elle indique que la baisse de liaison au récepteur AMPA n'est pas uniquement le résultat d'une destruction massive du tissu nerveux lors du traitement à la STZ.

Les mécanismes responsables de cette baisse de liaison au récepteur AMPA lors du diabète chez le rat demeurent inconnus. Il a été démontré, récemment, qu'une accumulation importante de composés cellulaires, provenant de la voie 12-lipoxygénase du métabolisme de l'acide arachidonique, est associée au développement du diabète mellitus chez le rat (Rosello-Catafau et coll., 1994a; Rosello-Catafau et coll., 1994b). Par ailleurs, des données rapportées dernièrement dans notre laboratoire indiquent que les métabolites produits à partir de la voie 12-lipoxygénase contribue à diminuer l'affinité du récepteur AMPA (Chabot et coll., 1998; Normandin et coll., 1996). Par conséquent, une formation exagérée de ces métabolites, dans la région hippocampale des rats diabétiques, pourrait être à la base des modifications biochimiques et électrophysiologiques des neurones glutamatergiques lors du diabète. Outre les lipoxygénases, des problèmes dans les mécanismes de recyclage des récepteurs à l'insuline furent constatés sur un modèle simulant le diabète et sur les monocytes des patients atteints de diabète mellitus (Benzi et coll., 1997; Kurbel et coll., 1997). Il serait donc envisageable qu'une perturbation de ces processus cellulaires de recyclage pour la sous-unité GluR₁ puisse être responsable des changements de propriétés fonctionnels des récepteurs AMPA.

D'autre part, nous avons évalué l'impact du diabète mellitus sur les niveaux de potentialisation (LTP) et de dépression (LTD) neuronales générées dans la région CA₁ des tranches d'hippocampe. Nos résultats indiquent que parmi les deux formes de plasticité synaptiques reproduites *in vitro*, seule l'expression de la LTP fut sévèrement réduite chez les rats diabétiques. De plus, il apparaît que cette perte de capacité à produire la LTP n'est pas imputable à un dysfonctionnement des récepteurs NMDA, puisque les réponses synaptiques assurées par ces derniers ne sont pas touchées par la condition diabétique. Cependant, l'analyse par Western Blot des différentes sous unités protéiniques susceptibles de composer le récepteur AMPA démontre qu'une baisse spécifique de l'immunoréactivité pour la sous-unité GluR₁ du récepteur AMPA est présente dans la région hippocampale des rats traités à la STZ. Il est donc fort probable que la baisse du niveau d'expression de l'unité GluR₁ explique la diminution de liaison au récepteur AMPA et le déficit en LTP dans ce modèle de diabète. Cette dernière interprétation est bien sûr consistante avec les travaux du Dr. Gary Lynch et de ses collaborateurs, lesquels ont démontré qu'une déplétion postsynaptique de la sous-unité GluR₁ du récepteur AMPA est associée à une incapacité de la région CA₁ de l'hippocampe à exprimer la LTP *in vitro* (Vanderklish et coll., 1992).

L'équipe de recherche du Dr Michel Baudry a démontré que la diminution sélective d'immunoréactivité pour la sous-unité GluR₁ peut toutefois survenir suite à l'action protéolytique d'une protéase neuronale (la calpaïne) sur la partie C-terminale des sous-unités GluR₁ (Bi et collaborateurs, 1997). Ainsi, tant la baisse de liaison au récepteur AMPA que la diminution de l'immunoréactivité pour la sous-unité GluR₁ et le déficit en LTP observé

chez les rats diabétiques pourraient être le résultat de l'action endogène de cette enzyme protéolytique. Plusieurs études seront nécessaires pour vérifier la nature exacte de cette modification en immunoréactivité de la sous-unité GluR₁.

Certaines études ont démontré que le traitement de coupes minces de cerveaux par du calcium génère une hausse de liaison de l'AMPA pour son récepteur (Tocco et coll., 1992a). Les mécanismes mis en cause dans cet effet ne sont pas encore connus mais il est raisonnable de suggérer que des systèmes enzymatiques activés par le calcium contribuent à cette hausse de liaison. Selon les travaux effectués dans notre laboratoire, il est fort probable que l'activation dans le tissu nerveux de phospholipases dépendantes du calcium participe à l'augmentation de liaison au récepteur AMPA. Fait remarquable, nos résultats démontrent clairement que l'augmentation de liaison au récepteur AMPA, induite par le calcium exogène, est grandement atténuée sur les coupes minces de cerveaux provenant d'animaux préalablement traités à la STZ. Cette observation laisse entrevoir la possibilité que l'injection de STZ chez le rat génère une cascade d'événements biochimiques entraînant une régulation inadéquate des récepteurs AMPA par les enzymes dépendantes du calcium. D'autre part, la perte de modulation du récepteur par des enzymes dépendantes du calcium n'est pas sans intérêt si l'on considère son éventuelle corrélation avec le déficit en LTP noté chez les animaux diabétiques. Les bases cellulaires expliquant ce déficit de régulation des récepteurs AMPA par le calcium lors du diabète ne sont pas connues, mais les divers travaux effectués dans le cadre de cette thèse tendent à confirmer que la perte de modulation de ce

récepteur au glutamate découle vraisemblablement d'une incapacité des phospholipases à modifier à la hausse l'affinité de ce dernier.

CONCLUSION

Les deux modèles animaux que nous avons utilisés pour la réalisation des travaux de la présente thèse ont permis d'apporter de nouvelles données littéraires intéressantes. Nos données montrent pour la première fois, que l'enrichissement ou l'affaiblissement cognitif chez le rat conduit à une altération des caractéristiques électrophysiologiques et biochimiques des récepteurs au glutamate. Au niveau électrophysiologique, une altération de sensibilité de la structure postsynaptique est responsable de la perte d'expression de la LTP dans nos deux modèles animaux. Ces changements sont spécifiques au récepteur AMPA puisqu'aucune modification au niveau du récepteur NMDA n'a été constatée, tant chez les rats enrichis cognitivement que ceux souffrant de diabète mellitus. Dans les deux cas, c'est une perte de capacité à moduler le récepteur AMPA par des agents exogènes, comme le calcium, la phosphatidylsérine et la phospholipase A₂ qui fut observée. Cependant, les causes de cette perte de régulation semblent différentes chez les rats enrichis versus les rats diabétiques.

Dans l'enrichissement, la hausse de liaison du ³H-AMPA pour ses récepteurs serait attribuable à l'action endogène d'enzymes dépendantes du calcium. À l'opposé, la baisse de liaison du ³H-AMPA pour ses récepteurs serait plutôt provoquée par des changements d'ordre moléculaire puisqu'une diminution de l'immunoréactivité pour la sous-unité GluR₁ du récepteur AMPA fut constatée. Il serait donc envisageable que différents systèmes cellulaires puissent modifier la fonction des neurones à glutamate à la hausse ou à la baisse.

Ainsi, l'ensemble des données recueillies propose que les récepteurs au glutamate subissent une modification dans leurs propriétés physiologiques lors d'une altération des fonctions mnésiques chez l'animal. Et ces modifications ressemblent fortement à celles observées dans la plasticité neuronale reproduite en laboratoire, constituant donc un modèle électrophysiologique valable. Finalement, nos travaux ont permis de caractériser les mécanismes cellulaires et moléculaires de type glutamatergique impliqués dans l'enrichissement cognitif et l'affaiblissement cognitif associé au diabète mellitus chez le rat. Pour conclure, nos résultats apportent une meilleure compréhension globale des processus neuronaux impliqués dans les phénomènes d'apprentissage et de mémorisation chez l'animal.

RÉFÉRENCES

- Abeliovich, A., Chen, C., Goda, Y., Silva, A.J., Stevens, C.F., & Tonegawa, S. Modified hippocampal long-term potentiation in PKC ϵ -mutant mice. Cell, 1993, 75, 1252-1262.
- Aihara, T., Tsukada, M., Crair, M.A.C., & Shinomoto, S. Stimulus-dependent induction of long-term potentiation in CA1 area of the hippocampus - Experiment and model. Hippocampus, 1997, 7, 416-426.
- Akers, R.F., Lovinger, D.M., Colley, P.A., Linden, D.J., Routtenberg, A. Translocation of protein kinase C activity may mediate hippocampal long-term potentiation. Science, 1986, 231, 587-589.
- Ambros-Ingerson, J., Xiao, P., Larson, J., & Lynch G. Waveform analysis suggests that LTP alters the kinetics of synaptic receptor channels. Brain Res., 1993, 620, 237-244.
- Ambros-Ingerson, J., Larson, J., Xiao, P., & Lynch, G. LTP changes the waveform of synaptic responses. Synapse, 1991, 9, 314-316.
- Angenstein, F., & Staak, S. Receptor-mediated activation of protein kinase C in hippocampal long-term potentiation: facts, problems and implication. Prog. Neuro-Psychopharmacol., 1997, 21, 427-454.
- Artola, A., and Singer, W. Long-term depression of excitatory synaptic transmission and its relationship to long-term potentiation. TINS, 1993, 16, 480-487.
- Artola, A., Broecher, S., & Singer, W. Different voltage-dependent thresholds for inducing long-term depression and long-term potentiation in slices of rat visual cortex. Nature, 1990, 347, 69-72.

- Bach, M.E., Hawkins, R.D., Osman, M., Kandel, E.R., & Mayford, M. Impairment of spatial but not contextual memory in CaMKII mutant mice with a selective loss of hippocampal LTP in the range of the theta frequency. Cell, 1995, 81, 905-915.
- Bar, P.R., Schotmann, P., Gispen, W.H., Tielen, A.M., Lopes, K.A., & Silva, F.H. Changes in synaptic membranes phosphorylation after tetanic stimulation in the dentate area of the rat hippocampal slice. Science, 1980, 198, 478-484.
- Barria, A., Muller, D., Derkach, V., Griffith, C., & Soderling, T.R. Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. Science, 1997, 276, 2042-2045.
- Baudry, M., & Lynch, G. Long-term potentiation : biochemical mechanisms. In: Baudry, Thompson and Davies, eds. Synaptic Plasticity: Molecular and Functional Aspects. Cambridge: MIT Press, 1993: 87-116.
- Baudry, M., & Massicotte, G. Physiological and pharmacological relationships between long-term potentiation and mammalian memory. Conc. Neurosci., 1992, 3, 79-98.
- Baudry, M., Massicotte, G., & Hauge, S. Phosphatidylserine increases the affinity of the AMPA/Quisqualate receptor in rat brain membranes. Behav. Neural Biol., 1991, 55, 137-140.
- Bear, M.F., & Malenka, R.C. Synaptic plasticity : LTP and LTD. Cur. Opin. in Neurobio., 1994, 4, 389-399.
- Bekkers, J.M., & Stevens, C.F. Presynaptic mechanism for long-term potentiation in the hippocampus. Nature, 1990, 346, 724-729.

- Ben-Ari, Y., & Gho, M. Long lasting modification of the synaptic properties of rats CA₃ hippocampal neurons induced by kainate. J. Physiol. (London), 1988, 404, 365-384.
- Benzi, L., Cecchetti, P., Ciccarone, A.M., Nardone, A., Merola, E., Maggiorelli, R., Campi, F., Di Cianni, G., Navalesi, R. Inhibition of endosomal acidification in normal cells mimics the derangements of cellular insulin and insulin-receptor metabolism observed in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Metabolism: Clinical & Experimental, 1997, 46, 1259-1265.
- Bernard, J., Chabot, C., Gagné, J., Baudry, M., & Massicotte, G. Melittin increases AMPA receptor affinity in rat brain synaptoneurosome. Brain Res., 1995, 671, 195-200.
- Bernard, J., Lahsaini, A., & Massicotte, G. Potassium-Induced Long-Term Potentiation in Area Ca1 of the Hippocampus Involves Phospholipase Activation. Hippocampus, 1994, 4, 1-7.
- Berridge, M.J. Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers. Biochem. J., 1984, 220, 345-360.
- Bi, X., Chen, J., Dang, S., Wenthold, R.J., Tocco, G., & Baudry, M. Characterization of calpain-mediated proteolysis of GluR1 subunits of α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate receptors in rat brain. J. Neurochem., 1997, 68, 1484-1494.
- Bi, X., Tocco, G., & Baudry, M. Calpain-mediated regulation of AMPA receptors in adult rat brain. Neuroreport, 1994, 6, 61-64.

- Biessels, G.J., Kamal, A., Ramakers, G.M., Urban, I.J., Spruijt, B.M., Erkelens, D.W., & Gispen, W.H. Place learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-induced diabetic rats. Diabetes, 1996, 45, 1259-1266.
- Bland, B.H. The physiology and pharmacology of hippocampal formation theta rhythms. Prog. Neurobiol., 1986, 26, 1-54.
- Bliss, T.V.P., & Collingridge, G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. Nature, 1993, 361, 31-9.
- Bliss, T.V.P., & Lomo, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate areas of the anesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. J. Physiol., 1973, 232, 331-356.
- Bohme, G.A., Bon, C., Stutzman, J.M., Doble, A., & Blanchard, A. Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. Eur. J. Pharmacol., 1991, 199, 379-381.
- Bramham, C.R., Alkon, D.L., & Lester, D.S. Arachidonic acid and diacylglycerol act synergistically through protein kinase C to persistently enhance synaptic transmission in the hippocampus. Neuroscience, 1994, 3, 737-743.
- Buch, P.A., & Muller, D. Induction of long-term potentiation is associated with major ultrastructural changes of activated synapses. PNAS, 1996, 93, 8040-8045.
- Burnashev, N., Zhou, Z., Neher, E., & Sakmann, B. Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptor subtypes. J. Physiol., 1995, 485, 403-418.

- Calabresi, P., Pisani, A., Mercuri, N.B., & Bernardi, G. Long-term potentiation in the striatum is unmasked by removing the voltage-dependent blockade of NMDA receptor channel. Eur. J. Neurosci., 1992a, 4, 929-935.
- Calabresi, P., Maj, R., Pisani, A., Mercuri, N.B., & Bernardi, G. Long-term synaptic depression in the striatum: physiological and pharmacological characterization. J. Neurosci., 1992, 12, 4224-4233.
- Cavus, I., & Teyler, T.J. NMDA receptor-independent LTP in basal versus apical dendrites of CA1 pyramidal cells in rat hippocampal slice. Hippocampus, 1998, 8, 373-379.
- Chabot, C., Gagné, J., Giguère, C., Charbonneau, B., Grandbois, M., Bernard, J., Baudry, M., & Massicotte, G. Bidirectional modulation of AMPA receptor properties by exogenous phospholipase A₂ in the hippocampus. Hippocampus, 1998, 8, 299-309.
- Chabot, C., Bernard, J., Normandin, M., Ohayon, M., Baudry, M., & Massicotte, G. Developmental changes in depolarization-mediated AMPA receptor modifications and potassium-induced long-term potentiation. Develop. Brain Res., 1996, 93, 70-75.
- Collingridge, G.L., Bashir, Z.I., Blake, J.F., Davies, C.H., Irving, A.J., Randall, A.D., & Schofield, J.G. Amino acid receptors and LTP in area CA1 of the hippocampus. In L.R. Squire and E. Lindenlaub (EDs), The biology of memory, Schattauer, Stuttgart, 1990, 233-250.
- Collingridge, G.L., & Lester, R.A.J. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. Pharmacol. Rev., 1989, 41, 143-210.
- Coomer, C. A model of associative long-term potentiation and long-term depression in a compartmental reconstruction of a neuron. Neurocomputing, 1997, 16, 189-205.

- Cotman, C.W., Bridges, R.J., Taube, J.S., Clark, A.S., Geddes, J.W., & Monaghan, D.T. The role of NMDA receptor in central nervous system plasticity and pathology. J. NIH Res., 1989, 1, 65-74.
- Cummings, J.L., Tomiyasu, U., Read, S., & Benson, D.F. Amnesia with hippocampal lesions after cardiopulmonary arrest. Neurology, 1984, 34, 679-681.
- Davies, S.N., Butcher, S.P., & Morris, R.G.M. The NMDA receptor antagonist D-2-amino-5-phosphopentane (D-AP5) impairs spatial learning and LTP in vivo at intracerebral concentrations comparable to those that block LTP in vitro. J. Neurosci., 1992, 12, 21-34.
- Davies, S.N., Lester, R.A., Reymann, K.G., & Collingridge, G.L. Temporally distinct pre- and post-synaptic mechanisms maintain long-term potentiation. Nature, 1989, 338, 500-503.
- Davis, G.W. Long-term regulation of short-term plasticity: a postsynaptic influence on presynaptic transmitter release. J. Physiol. Paris, 1995, 89, 33-41.
- Debray, C., Diabira, D., Gaiarsa, J.L., Benari, Y., & Gozlan, H. Contributions of AMPA and GABA (A) receptors to the induction of NMDAR-dependent LTP in CA1. Neurosci. Lett., 1997, 238, 119-122.
- Denny, J.B., Polan-Cintain, J., Ghuman, A., Wayner, M.J., & Armstrong, D.L. Calpain inhibitors block long-term potentiation. Brain Res., 1990, 534, 317-320.
- Doble, A. Excitatory amino acid receptors and neurodegeneration. Thérapie, 1995, 50, 319-337.

- Farooqui, A.A., & Horrocks, L.A. Excitatory amino acid receptors, neural membrane phospholipid metabolism and neurological disorders. Brain Res. Rev., 1991, 16, 171-191.
- Farooqui, A.A., Farooqui, T., Yates, A.J., & Horrocks, L.A. Regulation of protein kinase C activity by various lipids. Neurochem. Res., 1988, 13, 499-511.
- Fedorov, N.B., Brown, R.E., & Reymann, K.G. Fast increases of AMPA receptor sensitivity following tetanus-induced potentiation in the CA1 region of the rat hippocampus. Neuroreport, 1997, 8, 411-414.
- Flood, J.F., Mooradian, A.D., & Morley, J.E. Characteristics of learning and memory in streptozotocin-induced diabetic mice. Diabetes, 1990, 39, 1391-1398.
- Foster, T.C., & McNaughton, B.L. Long-term synaptic enhancement in CA1 is due to increased quantal size, not quantal content. Hippocampus, 1991, 1, 79-91.
- Foy, M.R., Stanton, M.E., Levine, S., & Thompson, R.F. Behavioral stress impairs long-term potentiation in rodent hippocampus. Behav. Neural Biol., 1987, 48, 138-149.
- Gagné, J., Giguère, C., Tocco, G., Ohayon, M., Thompson, R.F., Baudry, M., & Massicotte, G. Effect of phosphatidylserine on the binding properties of glutamate receptors in brain sections from adult and neonatal rats. Brain Res., 1996, 740, 337-345.
- Gellerman, D.M., Bi, X., & Baudry, M. NMDA receptor-mediated regulation of AMPA receptor properties in organotypic hippocampal slice cultures. J. Neurochem., 1997, 69, 131-136.

- Goda, Y., & Stevens, C.F. Long-term depression properties in a simple system. Neuron, 1996, 16, 103-111.
- Gribkoff, V.K., & Lum-Ragan, J.T. Evidence for nitric oxide synthase inhibitor-sensitive and insensitive hippocampal synaptic potentiation. J. Neurophysiol., 1992, 2, 639-642.
- Hawkins, L.M., Beaver, K.M., Jane, D.E., Taylor, P.M., Sunter, D.C., & Robert, P.J. Characterization of the pharmacology and regional distribution of (S)-[3H]-5-fluorowillardiine binding in rat brain. British J. Pharmacol., 1995, 116, 2033-2039.
- Hebb, D.O. The organization of behavior. New York : John Wiley and sons, 1949.
- Hölscher, C. Long-term potentiation : a good model for learning and memory? Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat., 1997, 21, 47-68.
- Huber, K.M., Mauk, M.D., & Kelly, P.T. Distinct LTP induction mechanisms: contribution of NMDA receptors and voltage-dependent calcium channels. J. Neurophysiol., 1995, 73, 270-279.
- Isaac, J.T.R., Nicoll, R.A., & Malenka, R.C. Evidence for silent synapses: Implications for the expression of LTP. Neuron, 1995, 15, 427-434.
- Izquierdo, I. & Medina, J.H. Role of the amygdala, hippocampus and entorhinal cortex in memory consolidation and expression. Brazilian J. Med. Biol. Res., 1993, 26, 573-589.
- Izumi, Y., Clifford, D.B., & Zorumski, C.F. Inhibition of long-term potentiation by NMDA-mediated nitric oxide release. Science, 1992, 257, 1273-1276.

- Johnston, D., Williams, S., Jaffe, D., & Gray, R. NMDA-receptor-independent long-term potentiation. Annu. Rev. Physiol., 1992, 54, 489-505.
- Kaczmarek, L., Malgorzata, K., & Skangiel-Kramska, J. Glutamate receptors in cortical plasticity: Molecular and cellular biology. Physiol. Rev., 1997, 77, 217-255.
- Kandel, E., & Hawkins, R. Les bases biologiques de l'apprentissage. Pour la science, 1992, 181, 70-78.
- Kauer, J.A., Malenka, R.C., & Nicoll, R.A. A persistent postsynaptic modification mediates long-term potentiation in the hippocampus. Neuron, 1988, 1, 911-917.
- Keller, B.U., Hollman, M., Heineman, S., & Konnerth, A. Calcium influx through subunits GluR1/GluR3 of kainate/AMPA receptor channels is regulated by cAMP dependent protein kinase. EMBO Journal, 1992, 11, 891-896.
- Kerr, D.S., Huggett, A.M., & Abraham, W.C. Modulation of hippocampal long-term potentiation and depression by corticosteroid receptor activation. Psychobiol., 1994, 22, 123-133.
- Kullmann, D.M. Amplitude fluctuations of dual-component EPSCs in hippocampal pyramidal cells: implications for long-term potentiation. Neuron, 1994, 12, 1111-1120.
- Kurbel, B., Kurbel, S., Kristek, Z., Jakic, M., Juric, M., Sulava, D. Simulation model of defective insulin receptors as byproducts of receptor recycling. Medical Hypotheses, 1997, 49, 165-170.

- Langdon, R.B., Johnson, J.W., & Barrionuevo, G. Posttetanic potentiation and presynaptically induced long-term potentiation at the mossy fiber synapse in rat hippocampus. J. Neurobiol., 1995, 26, 370-385.
- Lazarewicz, J.W., Wroblewski, J.T., Palmer, M.E., & Costa, E. Activation of N-methyl-D-aspartate-sensitive glutamate receptor stimulates arachidonic acids release in primary cultures of cerebellar granule cells. Neuropharm., 1988, 27, 765-769.
- Larson, J., & Lynch, G. Role of N-methyl-D-aspartate receptors in the induction of synaptic potentiation by burst stimulation patterned after the hippocampal theta rhythm. Brain Res., 1988, 441, 111-118.
- Larson, J., Wong, D., & Lynch, G. Patterned stimulation at the theta frequency is optimal for induction of long-term potentiation. Brain Res., 1986, 368, 347-350.
- Lerma, J., Morales, M., Vicente, M.A., & Herreras, O. Glutamate receptors of the kainate type and synaptic transmission. TINS, 1997, 20, 9-12.
- Liao, D., Hessler, N.A., & Malinow, R. Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. Nature, 1995, 375, 400-404.
- Linden, D.J., & Connor, J.A. Long-term depression. Annu. Rev. Neurosci., 1995, 18, 319-357.
- Linden, D.J. Long-term depression in the mammalian brain. Neuron, 1994, 12, 457-472.
- Lisman, J., Malenka, R.C., Nicoll, R.A., & Malinow, R. Learning mechanisms: the case for CaM-KII. Science, 1997, 276, 2001-2002.

- Loh, H.H., & Law, P.Y. The role of membrane lipids in receptor mechanisms. Annu. Rec. Pharmacol. Toxicol., 1980, 20, 210-234.
- Lu, Y.M., Jia, Z.P., Janus, C., Henderson, J.T., Gerlai, R., Wojtowicz, J.M., & Roder, J.C. Mice lacking metabotropic glutamate receptor 5 show impaired learning and reduced CA1 long-term potentiation (LTP) but normal CA3 LTP. J. Neurosci., 1997, 17, 5196-5205.
- Lynch, G. Memory and the Brain : Unexpected Chemistries and a New Pharmacology. Neurobiology of Learning and Memory, 1998, 70, 82-100.
- Lynch, M.A., Errington, M.L., & Bliss, T.V.P Nordihydroguaiaretic acid blocks the synaptic component of long-term potentiation and the associated increases in release of glutamate and arachidonate: an in vivo study in the dentate gyrus of the rat. Neurosci., 1989, 30, 693-701.
- Malenka, R.C., & Nicoll, R.A. Silent synapses speak up. Neuron, 1997, 19, 473-476.
- Malenka, R.C. Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD. Cell, 1994, 78, 535-538.
- Malenka, R.C., & Nicoll, R.A. NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms. Trends Neurosci., 1993, 16, 521-527.
- Malenka, R.C. Postsynaptic factors control the duration of synaptic enhancement in area CA1 of the hippocampus. Neuron, 1991, 6, 53-60.

- Malenka, R.C., Kauer, J.A., Perkel, D.J., Mauk, M.D., Kelly, P.Y., Nicoll, R.A. & Waxham, M.N. An essential role for postsynaptic calmodulin and protein kinase activity in long-term potentiation. Nature, 1989, 340, 554-557.
- Malenka, R.C., Kauer, J.A., Zucker, R.S., & Nicoll, R.A. Postsynaptic calcium is sufficient for potentiation of hippocampal synaptic transmission. Science, 1988, 242, 81-84.
- Malinow, R., & Tsien, R.W. Presynaptic enhancement shown by whole-cell recording of long-term potentiation in hippocampal slices. Nature, 1990, 346, 177-180.
- Manabe, T., and Nicoll, R.A. Long-Term Potentiation: Evidence Against an Increase in Transmitter Release Probability in the CA1 Region of the Hippocampus. Science, 1994, 265, 1888-1892.
- Maren, S., & Baudry, M. Properties and mechanisms of long-term synaptic plasticity in the mammalian brain: relationships to learning and memory. Neurobiol. Learn. Mem., 1995, 63, 1-18.
- Maren, S., Tocco, G., Standley, S., Baudry, M., & Thompson, R.F. Postsynaptic factors in the expression of long-term potentiation (LTP): increased glutamate receptor binding following LTP induction in vivo. PNAS, 1993, 90, 9654-9658.
- Martinez, J.L. Jr., & Derrick, B.E. Long-term potentiation and memory. Annu. Rev. Psychol., 1996, 47, 173-203.
- Massicotte, G., & Baudry, M. Triggers and substrates of hippocampal synaptic plasticity. Neurosci. Biobehav. Rev., 1991, 15, 415-423.

- Massicotte, G., Vanderklish, P., Lynch, G., & Baudry, M. Modulation of AMPA/Quisqualate receptors by phospholipase A2 : a necessary step in long-term potentiation. PNAS, 1991, 88, 1893-1897.
- Massicotte, G., & Baudry, M. Modulation of AMPA/Quisqualate receptors by phospholipase A2 treatment. Neurosci. Lett., 1990, 118, 245-248.
- Massicotte, G., Oliver, M.W., Lynch, G., & Baudry, M. Effect of bromophenacylbromide, a Phospholipase A2 inhibitor, on the induction and maintenance of LTP in hippocampal slices. Brain Res., 1990, 537, 49-53.
- Mayer, M.L., & Westbrook, G.L. The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. Prog. Neurobiol., 1987, 28, 197-276.
- Mayer, M.L., Westbrook, G.L., & Guthrie, P.B. Voltage-dependent block by Mg^{2+} of NMDA responses in spinal cord neurons. Nature, 1984, 309, 261-263.
- Mayford, M., Wang, J., Kandel, E.R., & O'Dell, T.J. CaMKII regulates the frequency-response function of hippocampal synapses for the production of both LTD and LTP. Cell, 1995, 81, 891-904.
- McDonald, J.W., & Johnston, M.V. Physiological and pathological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. Brain Res. Rev., 1990, 15, 41-70.
- Monaghan, D.T., Bridges, R.J., & Cotman, C.W. The excitatory amino acid receptors: Their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 1989, 29, 365-402.

- Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., Burnashev, N., Sakmann, B., & Seeburg, P.H. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. Science, 1992, 256, 217-221.
- Mooradian, A.D., Perryman, K., Fitten, J., Kavonian, G., & Morley, J.E. Cortical function in elderly non-insulin dependent diabetic patients: behavioral and electrophysiological studies. Arch. Intern. Med., 1988, 148, 2369-2372.
- Moriyoshi, K., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Mizuno, N., & Nakanishi, S. Molecular cloning and characterisation of the rat NMDA receptor. Nature, 1991, 354, 31-37.
- Morris, R.G.M., & Frey, U. Hippocampal synaptic plasticity: role in spatial learning or the automatic recording of attended experience ? Phil. Trans. R. Soc. Lond. B, 1997, 352, 1489-1503.
- Morris, R.G.M., Anderson, E., Lynch, G., & Baudry, M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP-5. Nature, 1986, 319, 774-776.
- Moser, M.B., Trommald, M., & Andersen, P. An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial-learning in adult-rats suggest the formation of new synapses. PNAS, 1994, 91, 12673-12675.
- Moser, E., Moser, M.B., & Andersen, P. Synaptic potentiation in the rat dentate gyrus during exploratory learning. Neuroreport, 1993, 5, 317-320.
- Muller, D., Oliver, M., & Lynch, G. Developmental changes in synaptic properties in hippocampus of neonatal rats. Dev. Brain Res., 1989, 49, 105-114.

- Muller, D., Joly, M., & Lynch, G. Contributions of quisqualate and NMDA receptors to the induction and expression of LTP. Science, 1988, 242, 1694-1697.
- Murphy, S.N., & Miller, R.J. A glutamate receptor regulates Ca^{2+} mobilization in hippocampal neurons. PNAS, 1988, 85, 8737-8741.
- Mushleh, W., Bi, X.N., Tocco, G., Yaghoubi, S., & Baudry, M. Glycine-induced long-term potentiation is associated with structural and functional modifications of alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors. PNAS, 1997, 94, 9451-9456.
- Nakanishi, S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. Science, 1992, 258, 597-603.
- Neveu, D., & Zucker, R.S. Postsynaptic levels of Ca^{2+} needed to trigger LTD and LTP. Neuron, 1996, 16, 619-629.
- Nicoll, R.A., Malenka, R.C., & Kauer, J.A. Functional comparison of neurotransmitter receptor subtypes in mammalian nervous system. Physiol. Rev., 1990, 70, 513-565.
- Noguès, X., Micheau, J., & Jaffard, R. Protein kinase C activity in the hippocampus following spatial learning tasks in mice. Hippocampus, 1994, 1, 71-78.
- Normandin, M., Gagné, J., Bernard, J., Élie, R., Miceli, D., Baudry, M., & Massicotte, G. Involvement of the 12-lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism in homosynaptic long-term depression of the rat hippocampus. Brain Res., 1996, 730, 40-46.
- Nowack, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbert, A., & Prochiantz, A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons. Nature, 1984, 307, 462-465.

- O'Dell, T.J., Hawkins, R.D., Kandel, E.R., & Arancio, O. Tests of the roles of two diffusible substance in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. PNAS, 1991, 88, 11285-11289.
- Okada, D., Yamagishi, S., & Sugiyama, H. Differential effects of phospholipase inhibitors in long-term potentiation in the rat hippocampal mossy fiber synapses and Schaffer/commissural synapses. Neurosci Lett., 1989, 100, 141-146.
- Olney, J.W. Excitotoxicity and N-methyl-D-aspartate receptor. Drug Dev. Res., 1989, 17, 299-319.
- Olson, T., Mohammed, A.H., Donaldson, L.F., Henriksson, B.G., & Seckl, J.R. Glucocorticoid receptor and NGFI-A gene expression are induced in the hippocampus after environmental in adult rats, Mol. Brain Res., 1994, 23, 349-353.
- Pavlidis, C., Watanabe, Y., & McEwen, B. Effects of glucocorticoids on hippocampal long-term potentiation. Hippocampus, 1993, 3, 183-192.
- Pawson, T. Introduction: Protein Kinases. FASEB, 1994, 8, 1112-1113.
- Pelligrini-Giampietro, D.E., Dennett, M.V.L., & Zukin, R.S. Differential expression of three glutamate receptor genes in developing rat brain: an *in situ* hybridization study. PNAS, 1991, 88, 4157-4161.
- Penfield, W. Some observations of the cerebral cortex of man. Ferrier Lecture, Proc. Roy. Soc. B., 1947, 134, 329-347.
- Redman, S. The hippocampus, long-term potentiation and memory. Clin & Exp. Pharm. & Physiol., 1996, 23, 961-964.

- Reymann, K.G., Frey, U., Jork, R., & Matthies, H. Polymixin B, an inhibitor of protein kinase C, prevents the maintenance of synaptic long-term potentiation in hippocampal CA1 neurons. Brain Res., 1988, 440, 305-314.
- Robinson, G.B., & Racine, R.J. Interactions between septal and entorhinal inputs to the rat dentate gyrus: facilitation effects. Brain Res., 1982, 249, 162-166.
- Rogel, J.P. La mécanique du souvenir. Québec Science, 1997, 36, 46-50.
- Rosello-Catafau, J., Closa, D., Hotter, G., Bulbena, O., Ortiz, M.A., Pou-Torello, J.M., Gimeno, M.A.F., & Gelpi, E. Pancreas lipoxygenase arachidonic acid metabolites production in streptozotocin-induced diabetes in rats. Horm. Metab. Res., 1994, 26, 387-388.
- Rosello-Catafau, J., Hotter, G., Closa, D., Ortiz, M.A., Pou-Torello, J.M., Gimeno, M.A.F., Bioque, G., & Gelpi, E. Liver lipoxygenase arachidonic acid metabolites in streptozotocin-induced diabetes in rats. Prostagl. Leukot. Essent. Fatty Acids, 1994, 51, 411-413.
- Ryan, C., Vega, A., & Drash, A. Cognitive deficits in adolescents who developed diabetes early in life. Pediatrics, 1985, 75, 921-927.
- Sakimura, K., Kutsuwada, T., Ito, I., Manabe, T., Takayama, C., Kushiya, E., Yagi, T., Aizawa, S., Inoue, Y., & Sugiyama, H. Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit. Nature, 1995, 373, 151-155.
- Scoville, W.B., & Milner, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 1957, 20, 11-21.

- Seubert, P., Larson, J., Oliver, M., Jung, M.W., Baudry, M., & Lynch, G. Stimulation of NMDA receptors induces proteolysis of spectrin in hippocampus. Brain Res., 1988, 460, 189-194.
- Seeburg, P.H. The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. TINS, 1993, 16, 359-365.
- Sejnowski, T.J. Storing covariance with nonlinearly interacting neurons. J. Math. Biol., 1977, 4, 303-321.
- Sergueeva, O.A., Fedorov, N.B., & Reymann, K.G. An antagonist of glutamate metabotropic receptors, (RS)- α -methyl-4-carboxyphenylglycine, prevents the LTP-related increase in postsynaptic AMPA sensitivity in hippocampal slices. Neuropharm., 1993, 32, 933-935.
- Shors, T.J., & Dryver, E. Stress impedes exploration and the acquisition of spatial information in the 8-arm radial maze. Psychobiol., 1992, 20, 247-253.
- Shors, T.J., & Thompson, R.F. Acute stress impairs (or induces) synaptic long-term potentiation (LTP) but does not affect paired-pulse facilitation in the stratum radiatum of rat hippocampus. Synapse, 1992, 11, 262-265.
- Shors, T.J., Levine, S., & Thompson, R.F. Effects of adrenalectomy and demedulation on the stress-induced impairment of long-term potentiation (LTP). Neuroendocrinology, 1990, 51, 70-75.
- Shors, T.J., Seib, T.B., Levine, S., & Thompson, R.F. Inescapable versus escapable shock modulates long-term potentiation (LTP) in rat hippocampus. Science, 1989, 244, 224-226.

- Silva, A.J., Stevens, C.F., Tonegawa, S., & Wang, Y. Deficient hippocampal long-term potentiation in α -calcium-calmodulin Kinase II mutant mice. Science, 1992, 257, 201-206.
- Sladeczek, F., Récasens, M., & Bockaert, J. A new mechanism for glutamate receptor action: phosphoinositide hydrolysis. TINS, 1988, 11, 545-549.
- Sokolov, M.V., Rossokhin, A.V., Behnisch, T., Reymann, K.G., & Voronin, L.L. Interaction between paired-pulse facilitation and long-term potentiation of minimal excitatory postsynaptic potentials in rat hippocampal slices - A patch-clamp study. Neuroscience, 1998, 85, 1-13.
- Sommer, B., Keinänen, K., Verdoorn, T.A., Wisden, W., Burnashev, N., Herb, A., Köhler, M., Takagi, T., Sakmann, B., & Seeburg, P.H. Flip and Flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. Science, 1990, 249, 1580-1585.
- Son, H., & Carpenter, D.O. Interactions among paired-pulse facilitation and post-tetanic and long-term potentiation in the mossy fiber CA3 pathway in rat hippocampus. Synapse, 1996, 23, 302-311.
- Son, H., Madelian, V., & Carpenter, D.O. The translocation and involvement of protein kinase C in mossy fiber-CA3 long term potentiation in hippocampus of the rat brain. Brain Res., 1996, 739, 282-292.
- Squire, L.R. Memory and Brain. New York, 1987, Oxford Univ. Press.

- Standley, S., Tocco, G., Tourigny, M.F., Massicotte, G., Thompson, R.F., & Baudry, M. Developmental changes in alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate receptor properties and expression in the rat hippocampal formation. Neurosci., 1995, 67, 881-892.
- Staubli, U., Rogers, G., & Lynch, G. Facilitation of glutamate receptors enhances memory. PNAS, 1994, 91, 777-781.
- Staubli, U., Larson, J., & Lynch, G. Mossy fiber potentiation and long-term potentiation involve different expression mechanisms. Synapse, 1990, 5, 333-335.
- Staubli, U., Thibault, O., Dilorenzo, M., & Lynch, G. Antagonism of NMDA receptors impairs acquisition but not retention of olfactory memory. Behav. Neurosci., 1989, 103, 54-60.
- Staubli, U., & Lynch, G. Stable hippocampal long-term potentiation elicited by theta pattern stimulation. Brain Res., 1987, 435, 227-234.
- Staubli, U., Baudry, M., & Lynch, G. Leupeptin, a thiol-proteinase inhibitor, causes a selective impairment of maze performance in rats. Behav. Neural Biol., 1984, 40, 58-69.
- Stent, G. A physiological mechanism for Hebb's postulate of learning. PNAS, 1973, 70, 997-1001.
- Steriade, M., Gloor, P., Llinas, R.R., Lopes da Silva, F.H., & Mesulam, M.M. Basic mechanisms of cerebral rhythmic activities. Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol., 1990, 76, 481-508.

- Stewart, M., & Fox, S.E. Do septal neurons pace the hippocampal theta rhythm. TINS, 1990, 13, 163-168.
- Stricker, C, Field, A.C., & Redman, S.J. Changes in quantal parameters of EPSCs in rat CA1 neurones in vitro after the induction of long-term potentiation. J. Physiol., 1996, 490, 443-454.
- Tan, S.E., & Chen, S.S. The activation of calcium/calmoduline-dependent protein kinase II after glutamate or potassium stimulation in hippocampal slices. Brain Res. Bull., 1997, 43, 269-273.
- Tan, S.E., & Liang, K.C. Spatial learning alters hippocampal calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity in rats. Brain Res., 1996, 711, 234-240.
- Tocco, G., Massicotte, G., Standley, S., Thompson, R.F., & Baudry, M. Effect of temperature and calcium on the binding properties of the AMPA receptor in frozen rat brain sections. Eur. J. Neurosci., 1992a, 4, 1093-1103.
- Tocco, G., Maren, S., Shors, T., Baudry, M., & Thompson, R.F. Long-term potentiation is associated with increased 3H-AMPA binding in rat hippocampus. Brain Res., 1992b, 573, 228-234.
- Tocco, G., Massicotte, G., Standley, S., Thompson, R.F., & Baudry, M. Phospholipase A2-induced changes in the affinity of the AMPA receptor: an autoradiographic study. Neuroreport, 1992c, 3, 515-518.
- Tocco, G., Shors, T.J., Baudry, M., & Thompson, R.F. Selective increase of AMPA binding to the AMPA/quisqualate receptor in the hippocampus in response to acute stress. Brain. Res., 1991, 559, 168-171.

- Torasdöter, M., Metsis, M., Henriksson, B.G., Winblad, B., & Mohammed, A.H. Expression of neurotrophin-3 mRNA in the rat visual cortex and hippocampus is influenced by environmental conditions, Neurosci. Lett., 1996, 218, 107-110.
- Vanderklish, P., Saido, T.C., Gall, C., Arai, A., & Lynch, G. Proteolysis of spectrin by calpain accompanies theta-burst stimulation in cultured hippocampal slices. Mol. Brain Res., 1995, 32, 25-35.
- Vanderklish, P., Neve, R., Bahr, B.A., Arai, A., Hennegrif, M., Larson, J., & Lynch, G. Translational suppression of a glutamate receptor subunit impairs long-term potentiation. Synapse, 1992, 12, 333-337.
- Verma, A., Hirsch, D.J., Glatt, C.E., Ronnett, G.V., & Snyder, S.H. Carbon monoxide : A putative neural messenger. Science, 1993, 259, 381-384.
- Vignes, M., & Collingridge, G.L. Synaptic activation of kainate receptor. Nature, 1997, 388, 179-182.
- Waters, N.S., Klintsova, A.Y., & Foster, T.C. Insensitivity of the hippocampus to environmental stimulation during postnatal development. J. Neurosci., 1997, 17, 7967-7973.
- Williams, J.H, Errington, M.L., Lynch, M.A., & Bliss, T.V.P. Arachidonic acid induced a long-term activity-dependent enhancement of synaptic transmission in the hippocampus. Nature, 1989, 341, 739-742.
- Williams, S., & Johnston, D. Long-term potentiation of hippocampal mossy fibers is blocked by postsynaptic injection of calcium chelators. Neuron, 1989, 3, 583-588.

- Willis, C.L., Wacker, D.A., Bartlett, R.D., Bleakman, D., & Lodge, D. Irreversible inhibition of high-affinity [3H]kainate binding by a novel photoactivable analogue : (2'S, 3'S, 4'R)-2'-carboxy-4'-(2-diazo-1-oxo-3, 3,3-trifluoropropyl)-3'-pyrrolidiny acetate. J. Neurochem., 1997, 68, 1503-1510.
- Wisden, W., & Seeburg, P.H. Mammalian ionotropic glutamate receptors. Current Opinion in Neurobiol., 1993, 3, 291-298.
- Woods, B.T., Schoene, W., & Kneisley, L. Are hippocampal lesions sufficient to cause lasting amnesia ? J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 1982, 45, 243-247.
- Zalutsky, R.A., & Nicoll, R.A. Comparaison of two forms of long-term potentiation in single hippocampal neurons. Science, 1990, 248, 1619-1624.
- Zhuo, M., & Hawkins, R.D. Long-term depression: a learning-related type of synaptic plasticity in the mammalian central nervous system. Reviews Neurosci., 1995, 6, 259-277.
- Zhuo, M., Small, S.A., Kandel, E.R., & Hawkins, R.D. Nitric oxide and carbon monoxide produce activity-dependent long-term synaptic enhancement in hippocampus. Science, 1993, 260, 1946-1950.
- Zola-Morgan, S., Squire, L.R., & Amaral, D.G. Human amnesia and the medial temporal region: Enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 to the hippocampus. J. Neurosci., 1986, 6, 2950-2967.

Zwaal, R.F., Bevers, E.M., Comfurius, P., Rosing, J., Tilly., R.H.J., & Verhallen, P.F.J.
Loss of membrane phospholipid asymmetry during activation of blood platelets and
sickled red cells; mechanisms and physiological significance. Mol. Cell. Biochem.,
1989, 91, 23-31.